



Signaux électriques des îlots pancréatiques enregistrés sur matrices de microélectrodes : caractérisation et application au phénotypage d'animaux transgéniques

Fanny Lebreton

► To cite this version:

Fanny Lebreton. Signaux électriques des îlots pancréatiques enregistrés sur matrices de microélectrodes : caractérisation et application au phénotypage d'animaux transgéniques. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0274 . tel-01153629

HAL Id: tel-01153629

<https://theses.hal.science/tel-01153629>

Submitted on 20 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE « Sciences de la Vie et de la Santé »
SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

par **Fanny LEBRETON**

SIGNAUX ÉLECTRIQUES DES ÎLOTS PANCRÉATIQUES ENREGISTRÉS SUR MATRICES DE MICROÉLECTRODES

**Caractérisation et application au phénotypage
d'animaux transgéniques**

Sous la direction du
Pr. Jochen LANG

Soutenue publiquement le 17 décembre 2014

Devant la commission d'examen formée de :

M. Jean-Pierre SAVINEAU, Professeur, Université de Bordeaux
M. Stéphane DALLE, Directeur de Recherche, INSERM
M. Christophe MAGNAN, Professeur, Université Paris 7 Denis Diderot
M. Blaise YVERT, Directeur de Recherche, INSERM
M. Bogdan CATARGI, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
M. Matthieu RAOUX, Maître de Conférences, Université de Bordeaux
M. Jochen LANG, Professeur, Université de Bordeaux

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité du Jury
Directeur de thèse

RÉSUMÉ

Titre : Signaux électriques des îlots pancréatiques enregistrés sur matrices de microélectrodes : caractérisation et application au phénotypage d'animaux transgéniques.

Les cellules β des îlots de Langerhans jouent un rôle central dans l'homéostasie glucidique car elles seules sécrètent l'insuline, unique hormone hypoglycémisante de l'organisme. La cellule β est un détecteur du glucose qui couple sa réponse sécrétoire et son expression génique aux niveaux ambiants de glucose. Le couplage entre le métabolisme du glucose et l'exocytose des granules d'insuline implique la génération d'une activité électrique. Son étude est importante pour déchiffrer la façon dont la cellule β encode la demande en insuline de l'organisme. Afin de contourner les limites des approches électrophysiologiques classiques incompatibles avec les études à long-terme, les enregistrements extracellulaires par matrice de microélectrodes (MEA) ont été mis en place.

L'objectif de ma thèse était de mieux comprendre les signaux complexes enregistrés par MEAs. Cette étude a révélé l'existence d'une nouvelle signature électrique des cellules des îlots, les slow potentials (SP), qui reflète la fonction de couplage des cellules β . Les SP jouent un rôle important dans l'homéostasie du glucose et représentent un biomarqueur de la fonction normale des îlots. La réponse en hystérèse des îlots au glucose suggère l'existence d'un algorithme d'encodage de la demande en insuline intégrée au niveau du micro-organe. De plus, ce nouveau signal a été exploité pour le phénotypage d'îlots de souris invalidées pour le gène GluK2, que nous avons utilisées comme modèle d'interaction entre les cellules α et β . La caractérisation de ce nouveau type de signal constitue aussi une avancée importante pour le développement d'un biocapteur destiné à être intégré dans le futur à un pancréas artificiel.

Mots clés : îlots de Langerhans, cellules β , électrophysiologie, matrices de microélectrodes, signalisation, couplage, jonction communicantes, oscillations

ABSTRACT

Title: Electrical signals from pancreatic islets recorded on multielectrode arrays: characterization and application to the phenotyping of transgenic animals.

Pancreatic β cells are central to glucose homeostasis because they are the only cell that secretes insulin, the sole hypoglycemic hormone in the organism. The β cell is a glucose sensor that regulates its secretory response and gene expression according to ambient glucose levels. The coupling between glucose metabolism and insulin granule exocytosis involves the generation of electrical activity. An investigation of this activity is important to decipher how β cells encode the organism's insulin demand. In order to overcome the limits of classically used electrophysiological approaches that are not compatible with long-term studies, extracellular recordings using multielectrode arrays (MEA) have been set-up.

My thesis aim was to better understand the complex signals recorded with MEA. This study revealed the existence of a new electrical signature of islet cells: slow potentials (SP) that reflect the coupling function of β cells. SP play an important role in glucose homeostasis and represent a biomarker of normal functioning of islets. The observed hysteretic response of islets to glucose suggests the existence of an algorithm encoding the insulin demand embedded at the microorgan level. Moreover, this new signal was used for the phenotyping of GluK2 deficient mouse islets that were employed as an α -to- β cell interaction model. The characterization of this new signal is an important progress in the development of a biosensor intended to be integrated in an artificial pancreas in the future.

Keywords: Islets of Langerhans, β -cells, electrophysiology, microelectrode arrays, signalling, coupling, gap junctions, oscillations

UNITÉ DE RECHERCHE

Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets – UMR CNRS 5248

Allée Geoffroy S^t Hilaire Bât. B14,

33600 PESSAC,

FRANCE



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres qui composent mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail. De même, je remercie les membres du comité de suivi à mi-parcours de ma thèse, M. Christophe Magnan, M. Gwendal LeMasson, et M. Jean-François Quignard d'avoir contribué à faire avancer mon projet par leurs remarques enrichissantes.

Merci également à M. Paolo Meda pour avoir accepté de me fournir généreusement des animaux transgéniques Cx36-déficientes, MM. Thierry Berney et Domenico Bosco pour l'envoi d'îlots humains, ainsi que M. Christophe Mulle pour les souris GluK2-déficientes, ainsi que Noëlle Grosjean avec qui j'ai échangé plus fréquemment et qui m'a indiquée lorsque des animaux étaient disponibles pour mes expériences. Sans votre aide, une grande partie de mon travail n'aurait pu être réalisée.

Je remercie également tout le groupe LANG. Merci à toi Julien, de m'avoir prise sous ton aile lors de mon arrivée dans l'équipe, moi la petite nouvelle qui ne connaissais rien de rien aux îlots. Grâce à toi j'ai pu maîtriser l'art d'isoler les îlots, ainsi que les bases de la culture cellulaire, des tests de sécrétion et des OGTT ! Alexandra, merci pour ton grand sens de l'organisation, ton aide aura été précieuse et indispensable à bien des égards, tu m'as grandement facilité la vie en t'occupant de toutes les commandes ! Et j'aurai découvert avec toi certaines manips de bioch et biomol, même si celles-ci ne m'ont pas servi dans mon projet. Pier, merci pour ta gentillesse à toute épreuve et tes conseils. Matthieu, un très très grand merci à toi qui m'as enseigné toutes les ficelles des enregistrements par MEA, d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions parfois un peu bêtes, pour ton aide ces derniers jours. Encore félicitation pour ton petit bout-de-chou né cette année. Eileen, merci d'avoir toujours eu la gentillesse de bien vouloir corriger mes abstracts. J'ai apprécié me balader dans Paris avec toi lors du congrès de la SFD 2014. Romain, merci de prendre le relai sur le projet GluK2, je te souhaite tout plein de bons résultats pour la suite !

Merci également à ceux et celles que j'ai croisé(e)s sur ma route au cours de ces trois années : Benoît, on ne s'est pas côtoyés très longtemps, mais tu m'as donné des conseils qui m'ont été très utiles tout au long de ma thèse. Te voir écrire ta thèse en un temps record avec courage m'avait impressionnée, et je m'étais dit « pitié pas moi ! » et me jurant de commencer à écrire la mienne bien en avance, certaine de ne pas être capable de faire comme toi. Finalement, j'ai suivi ton exemple, pas aussi glorieusement, mais je me suis accrochée. J'ai été heureuse de t'avoir rencontré pour ta bonne humeur et ta joie de vivre. Angélique, tu auras été là à mes débuts, ce fut un plaisir de partager des après-midi d'expériences, moi au MEA, toi à l'imagerie calcique, éclairées de notre petite lampe de bureau ! Une pensée pour

Anton également, avec tes éternelles blagues et ton sens de l'humour ! Grâce à toi, les longues expériences sont passées plus vite.

Je ne pourrai pas terminer ce petit tour d'horizon du laboratoire sans remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Jochen. Merci d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir accueillie dans votre équipe, alors que j'étais plutôt inexpérimentée dans la physiologie cellulaire à mon arrivée. Merci pour votre soutien, pour vos conseils. Merci de m'avoir guidée au cours de ces trois dernières années et d'avoir été si compréhensif avec moi ces dernières semaines. J'aurai appris énormément au cours de cette thèse grâce à vous. Merci de m'avoir fait aimer la physiologie des cellules β !

Je tiens également à remercier Yoon Cho, qui m'a encadrée pendant mes deux années de master et qui m'a encouragée à continuer dans la recherche.

Je voudrais également remercier M. Nicolas Mano, du CRPP, de m'avoir laissée utiliser son équipement de traitement plasma, qui nous était indispensable pour nos expériences MEAs. Pour la même raison, merci à Mme Sophie Lecomte d'avoir pris le relai en mettant à notre disposition le plasma cleaner nouvellement acquis de son équipe : cela nous a permis de gagner un temps considérable ! Enfin, merci à l'équipe de gestionnaires comptables du CBMN, en particulier Karine Lanusse, pour leur aide pour les réservations des billets pour les missions en congrès. Enfin, un grand merci à tous les membres des animaleries de l'Université de Bordeaux : Raphaël Pineau et Marie-Paule Algéo de l'animalerie mutualisée de Talence, toujours disponibles et aimables. Merci à l'équipe de l'animalerie conventionnelle à Carreire en particulier Laetitia Médan pour avoir accueilli nos souris Cx36 KO et s'en être occupée, à Audrey Lacquemant qui a pris soin des animaux que me fournissait M. Mulle, merci pour sa patience et ses conseils, et merci aussi à Mélissa Dehors. Merci à Pierre Costet et Ahn de l'animalerie spécialisée qui gère la production d'animaux de la lignée GluK2, pour avoir organisé avec Raphaël Pineau le transfert de nos animaux vers l'animalerie mutualisée.

Enfin, je ne serai pas là sans mes parents qui m'ont toujours aidée et m'ont permis de pouvoir arriver aussi loin. Alors merci beaucoup Papa, Maman, de m'avoir permis de suivre ma voie, de m'avoir encouragée et d'avoir cru en moi. Merci à toi aussi Quentin, mon petit frère. Même si nous ne nous voyons pas souvent, je pense souvent à toi et je suis vraiment très heureuse que tu viennes sur Bordeaux spécialement pour assister à ma soutenance, malgré le peu de jours de congé dont tu disposes. Une pensée également à toute ma famille, mes oncles et tantes, mon grand-père. Même si je me suis un peu éloignée de ma thématique de recherche initiale au cours de ces 3 ans, j'y reviendrai et continuerai à chercher et chercher encore pour vous.

Merci à mes amis les plus chers. À toi Morgane, merci d'être restée mon amie malgré les difficultés et la distance, merci de m'avoir invitée à venir partager avec toi et ton âme sœur le plus beau jour de votre vie. Je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui sans ton amitié.

Marie, merci d'être restée mon amie malgré la distance et l'éloignement. Tu seras toujours ma meilleure amie d'enfance et j'espère te revoir très bientôt. Marion, ma camarade de licence, nous en aurons parcouru du chemin toutes les deux pour finalement nous retrouver sur Bordeaux il y a quelques mois ! Et enfin Célia, mon ancienne presque voisine et collègue de révisions ! Merci merci merci de te déplacer pour ma soutenance !

Pour finir, milles mercis à toi Jean d'avoir été là, tous les jours, de m'avoir supportée, surtout ces dernières semaines. Cette thèse aura un peu été notre aventure à tous les deux, puisque tu es venu me rejoindre il y a trois ans. Grâce à toi, à ta présence, j'ai pu tenir dans les moments difficiles. Je n'aurai pas assez de mots pour te dire combien tu m'as apporté, alors je me contenterai d'un merci, et d'un je t'aime.

Ainsi s'achèvent ces trois années de doctorat. J'ai l'impression que c'était hier que je commençais ma petite vie de thésarde, remplie de doutes et d'appréhension de m'écarter du chemin des Neurosciences pour m'engager dans ce monde nouveau pour moi de la cellule β . Au final, cela aura passé très vite, et m'aura fait grandir aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan personnel, car j'ai appris beaucoup de chose sur moi-même au cours de cette expérience : la patience, l'organisation, et tant d'autres choses encore (mais je pense que Matthieu et Jochen seront d'accord avec moi si je dis que j'ai encore beaucoup d'efforts à faire concernant la gestion du stress). Je n'oublierai jamais ces trois années de ma vie qui auront été tellement enrichissantes, et tout cela, grâce à vous !

Ainsi, le mot « merci » est sans doute l'un des plus utilisés dans ce manuscrit après les termes « cellule β » et « îlots » mais c'est normal car ma reconnaissance envers vous tous fait également partie de l'aboutissement de ces trois ans, parce que je ne serais jamais arrivée là où j'en suis aujourd'hui grâce à vous tous. Donc, pour cela et pour tellement d'autres choses encore, je vous dis à tous :

MERCI

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS	17
INTRODUCTION.....	21
1. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE	23
1.1. <i>La glycémie et l'importance de son maintien</i>	23
1.2. <i>Mécanismes de régulation de l'homéostasie glucidique</i>	25
1.2.1. Les principaux régulateurs de la glycémie	25
○ <i>Les organes effecteurs et leur mode d'action</i>	25
○ <i>La détection du glucose.....</i>	32
○ <i>Les hormones peptidiques.....</i>	34
1.2.2. La régulation postprandiale de la glycémie : plusieurs phases distinctes.....	35
○ <i>Phase céphalique : régulation nerveuse de la libération d'insuline</i>	36
○ <i>Phase entéro-insulaire : l'effet incrétine</i>	36
○ <i>Phase insulaire.....</i>	37
1.3. <i>Dérégulation de l'homéostasie glucidique et conséquences pathologiques</i>	37
1.3.1. Les diabètes sucrés : définition et épidémiologie	37
1.3.2. Complications pathologiques	39
1.3.3. Traitements existants.....	40
○ <i>Traitements actuels du diabète de type 2.....</i>	40
○ <i>Traitements actuels du diabète de type 1.....</i>	41
○ <i>Alternatives thérapeutiques en cours de développement.....</i>	43
2. LE PANCRÉAS ENDOCRINE.....	45
2.1. <i>Le pancréas : un organe, deux fonctions</i>	45
2.2. <i>La découverte du rôle endocrine du pancréas</i>	47
2.3. <i>L'îlot de Langerhans : un micro-organe à part entière</i>	49
2.3.1. Composition et organisation cellulaire	49
2.3.2. Vascularisation	51
2.3.3. Innervation	52

3. LA CELLULE B INSULINOSÉCRÉTRICE	56
3.1. <i>Un détecteur du glucose essentiel au maintien de la glycémie</i>	56
3.2. <i>L'insuline</i>	57
3.2.1. Fonctions	57
3.2.2. Structure.....	58
3.2.3. Synthèse et maturation	59
3.3. <i>Détection des besoins en insuline par la cellule β.....</i>	62
3.3.1. Couplage stimulus-sécrétion	62
○ <i>Phase proximale : entrée et métabolisme du glucose dans le cytosol</i>	63
○ <i>Facteurs de couplage mitochondriaux</i>	64
○ <i>Phase distale : excitabilité membranaire et déclenchement de l'exocytose</i>	67
3.3.2. Les modulations de la sécrétion d'insuline	68
○ <i>Voie déclenchante et voie amplificatrice.....</i>	68
○ <i>Les inhibiteurs de la sécrétion d'insuline</i>	71
3.3.3. Dynamique de la sécrétion d'insuline	71
○ <i>L'exocytose des granules d'insuline.....</i>	71
○ <i>La sécrétion d'insuline suit un profil biphasique</i>	73
○ <i>Les différents pools de vésicules d'insuline et leur mobilisation</i>	74
4. LES CANAUX IONIQUES DE LA CELLULE B	78
4.1. <i>Généralités</i>	78
4.2. <i>Importance physiologique dans la cellule β.....</i>	80
4.3. <i>Chronologie des événements ioniques dans la cellule β.....</i>	82
4.3.1. Le potentiel de repos et l'initiation de l'activité électrique	82
4.3.2. Le potentiel d'action	85
4.3.3. La repolarisation de la membrane à la fin de la bouffée	89
4.4. <i>Les canaux K_{ATP} et Ca_v : des acteurs cruciaux du couplage</i>	89
4.4.1. Le canal K_{ATP}	90
4.4.2. Arrangement spatial et fonctionnel des canaux voltage-dépendants	92
5. LES MÉCANISMES DE RÉGULATION AU SEIN DE L'ÎLOT	95
5.1. <i>Les autres cellules endocrines de l'îlot</i>	96
5.1.1. La cellule α	96
5.1.2. La cellule δ	99

5.2. Régulations autocrines et paracrines des cellules β et α	100
5.2.1. Les facteurs émis par la cellule β	100
5.2.2. Les facteurs émis par la cellule α	102
5.2.3. Quelle est la situation <i>in vivo</i> ?.....	105
6. LE COUPLAGE CELLULAIRE PAR LES JONCTIONS COMMUNICANTES.....	106
6.1. Fonctions et structure	106
6.2. Propriétés et régulation	109
6.3. Les jonctions communicantes dans les îlots.....	111
6.4. Modèles d'étude	114
7. L'ACTIVITÉ OSCILLATOIRE DE LA CELLULE B	117
7.1. L'intérêt des signaux oscillatoires	117
7.2. De multiples oscillations dans la cellule β	118
7.3. Il y a-t-il un oscillateur ?.....	120
8. LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DES ÎLOTS	126
8.1. Introduction	126
8.2. Les matrices de microélectrodes, dites « Multielectrode Arrays » (MEA)	129
8.2.1. Principe de la technique et signaux enregistrés.....	129
8.2.2. Avantage de l'utilisation des MEAs dans l'étude des îlots	131
OBJECTIFS DE LA THÈSE	133
PREMIÈRE ÉTUDE : CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU SIGNAL	
ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE DANS LES ÎLOTS ENREGISTRÉS PAR MEA	141
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE À L'ARTICLE	143
2. MANUSCRIT	145
3. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	166
SECONDE ÉTUDE : GLUK2 ET VIEILLISSEMENT : RÔLE DE	
L'AUTORÉGULATION DE LA CELLULE A DANS LA PERTE DE FONCTION DES	
ÎLOTS DE LANGERHANS	173
1. INTRODUCTION : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	175

2. MÉTHODES	179
3. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	181
DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION	185
1. LES SLOW POTENTIALS	187
1.1. <i>Discussion des résultats</i>	187
1.2. <i>Perspectives</i>	190
2. GLUK2 ET VIEILLISSEMENT.....	194
2.1. <i>Discussion des résultats</i>	194
2.2. <i>Perspectives</i>	196
3. CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	198
ANNEXES.....	201
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203
LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES	220

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<i>Figure 1 : Régulation de la glycémie.</i>	26
<i>Figure 2 : Variations de la glycémie et de l'insulinémie après un repas.</i>	36
<i>Figure 3 : Diabète, prévalence et mortalité.</i>	38
<i>Figure 4 : Localisation et anatomie du pancréas humain.</i>	46
<i>Figure 5 : Différences inter-espèces dans l'anatomie des îlots de Langerhans.</i>	50
<i>Figure 6 : Schéma de l'innervation de l'îlot par le système nerveux autonome.</i>	54
<i>Figure 7 : Structure de l'insuline</i>	58
<i>Figure 8 : Synthèse et maturation de l'insuline dans la cellule-β</i>	61
<i>Figure 9 : Phases proximale et distale du couplage stimulus sécrétion dans la cellule β</i>	62
<i>Figure 10 : Quelques facteurs mitochondriaux et leur production</i>	65
<i>Figure 11 : La voie déclenchante et les voies amplificatrices de la sécrétion de l'insuline</i> ...	69
<i>Figure 12 : La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est biphasique.</i>	73
<i>Figure 13 : Les pools vésiculaires impliqués dans la sécrétion biphasique d'insuline</i>	75
<i>Figure 14 : Différents potentiels d'activation des canaux calciques voltage-dépendants</i>	79
<i>Figure 15 : Activité électrique induite par le glucose dans les îlots de souris et humains</i>	83
<i>Figure 16 : Les canaux ioniques activés au cours du potentiel d'action dans la cellule β</i>	85
<i>Figure 17 : Séquence des événements ioniques dans la cellule β de souris</i>	87
<i>Figure 18 : Séquence des événements ioniques dans la cellule β humaine</i>	88
<i>Figure 19 : Structure moléculaire du canal K_{ATP} et ses mécanismes de régulation</i>	91
<i>Figure 20 : Activité des canaux Ca^{2+} pendant la sécrétion biphasique de l'insuline</i>	93
<i>Figure 21 : Organisation structurale du proglucagon et des peptides dérivés</i>	96
<i>Figure 22 : Comparaison du couplage entre glucose et sécrétion dans les cellules β et α</i>	98

<i>Figure 23 : Les régulations paracrines et autocrines des cellules α et β pancréatiques.....</i>	103
<i>Figure 24 : Morphologie et structure des jonctions communicantes</i>	107
<i>Figure 25 : L'ouverture des canaux jonctionnels est régulée par le calcium</i>	110
<i>Figure 26 : Effets de la signalisation par la connexine 36 dans les cellules β</i>	112
<i>Figure 27: Suppression de l'expression de la connexine 36 dans la cellule β</i>	115
<i>Figure 28 : La connexine 36 est essentielle pour la sécrétion d'insuline</i>	116
<i>Figure 29 : La pulsatilité de la sécrétion d'insuline se retrouve à différents niveaux.....</i>	119
<i>Figure 30 : Les oscillations dans la cellule β.....</i>	120
<i>Figure 31 : Le potentiel d'action extracellulaire.....</i>	130
<i>Figure 32 : Propriétés des enregistrements intracellulaires vs extracellulaires</i>	132
<i>Figure 33 : Principe de l'utilisation des MEAs pour l'étude des îlots</i>	137
<i>Figure 34 : Principe de fonctionnement du capteur hybride bioélectronique Diaβsensor. 200</i>	
<i>Tableau 1 : Les différents types de canaux calciques voltage-dépendants</i>	84
<i>Tableau 2 : Les différentes connexines retrouvées chez l'Homme et la souris</i>	109
<i>Tableau 3 : Les principales oscillations de l'activité du pancréas endocrine</i>	122

FIGURES ET TABLEAUX DE LA PREMIÈRE ÉTUDE

<i>FIG. 1: Mouse islet cells cultured on multielectrode arrays generate 2 types of extracellular electrical signals.</i>	159
<i>FIG. 2: Slow potentials from mouse islet cells require K_{ATP} as well as voltage-gated calcium channels and are generated by beta-cells.....</i>	160
<i>FIG. 3: Slow potentials in mouse islet cells show a hysteretic glucose-dependence and are potentiated by GLP-1.</i>	161
<i>FIG. 4: Slow potentials are dependent on Cx36 gap junction channels.</i>	162
<i>FIG. 5: Human islets show glucose-dependent slow potentials.....</i>	163

<i>FIG. 6: Slow and action potentials reflect different cell-cell coupling and cell types in islets.</i>	164
<i>ESM Supplemental FIG. 1: Glucose-evoked slow potentials are generated at physiological extracellular calcium levels.</i>	165
<i>ESM Supplemental Table 1: Characteristics of human islet donors.</i>	165
<i>FIG. S1: Repartition of slow potentials and action potentials on recording electrodes.</i>	166
<i>FIG. S2: Calcium sensitivity of electrical signals in mouse islets and clonal cells</i>	167
<i>FIG. S3: Purinergic signalisation is not involved in slow potential generation.</i>	168
<i>FIG. S4: Slow potentials depend on gap junctional coupling between β-cells.</i>	169
<i>FIG. S5 : Example of signal processing using customized algorithms</i>	170
<i>Table S1: Blind ranking of recordings (AP) at different glucose concentrations.</i>	171

FIGURES ET TABLEAUX DE LA SECONDE ÉTUDE

<i>Fig 1 : Expression de la sous-unité GluK2 dans les îlots de Langerhans.</i>	176
<i>Fig 2 : Suppression de l'expression du gène codant pour GluK2 par recombinaison homologue</i>	180
<i>Fig 3: Islets from middle aged GluK2-deficient mice tend to have a better sensitivity to glucose than islets from age-matched wildtype mice.</i>	181
<i>Fig 4: 14 weeks-old GluK2 deficient mice have a significantly better glucose tolerance than age-matched wild-type animals.</i>	182

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine, sérotonine
ABC	ATP-binding cassette
ABCC8	ABC, sub-family C member 8, SUR2A et SUR2B
ABCC9	ABC, sub-family C member 9, SUR1
AC	Adénylate cyclase
ACh	Acétylcholine
ADP	Adénosine bi-phosphate
AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AMPc / cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
AP / PA	Action potential / Potentiel d'action
ARNm	Acide-robnucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AVL	Aire ventro-laétérale de l'hypothalamus
AVM	Aire ventro-médiane de l'hypothalamus
CaM	Calmoduline
CART	Cocain- amphetamine-regulated transcript
Ca _v /VDCC	Canaux calciques voltage-dépendants
<i>Ca_T</i>	<i>de type T</i>
<i>Ca_L</i>	<i>de type L</i>
<i>Ca_{P/Q}</i>	<i>de type P/Q</i>
<i>Ca_R</i>	<i>de type R</i>
<i>Ca_N</i>	<i>de type N</i>
Cbx	Carbenoxolone
CFP	Cyan fluorescent protein
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CK1	Casein kinase 1
Cx36	Connexin 36
DAG	Diacylglycerol
DDP-4	Dipeptidyl peptidase 4
DHP	Dihydropyridines
DM	Diabète mellitus
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
EGF	Epidermal growth factor
Epac2A	Exchange protein activated by cAMP 2A
FOPP	Fraction of plateau phase
frt	Flippase recognition target

G6P	Glucose-6-Phosphate
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GE	Neurones excités par le glucose
GFP	Green fluorescent protein
GI	Neurones inhibés par le glucose
GIP	Glucose-dependent insulintropic peptide
GK	Glucokinase
GLP-1, GLP-2	Glucagon-like peptide 1 ou 2
GluK2	Glutamate receptor, ionotropic kainate 2
GLUT1-3	Glucose transporter 1, 2 ou 3
GRP	Gestrin releasing peptide
GRPP	Glicentin-related pancreatic peptide
GWAS	Genome-wide associated study
Hept	Heptanol-1
hERG	Human ether-à-go-go-related gene - K _v 11.1
IAPP	Islet amyloid polypeptide, amyline
iGluR	Récepteur glutamatergique ionotrope
IP-1, IP-2	Intervening peptide 1 ou 2
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IPGTT	Intraperitoneal tolerance test
IRP	Immediately releasable pool
K _{ATP}	Canal potassique sensibles à l'ATP, aux purines
K _{Ca}	Canaux potassiques sensibles au calcium
<i>BK</i>	<i>à large conductance</i>
<i>SK</i>	<i>à faible conductance</i>
Kir6.1, Kir6.2	Canal potassique à rectification entrante 6.1 ou 6.2, sous-unité du K _{ATP}
K _v	Canaux potassiques voltage-dépendants
LC-CoA	Long-chaîne acyl-CoA / Acides gras à longue chaîne
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEA	Multielectrode array
mGluR	Récepteur glutamatergique métabotrope
MPGF	Major proglucagon-derived fragment
NA	Noradrénaline
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné
NADP	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
NADPH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé
Na _v	Canaux sodiques voltage-dépendants
NBD1, NBD2	Nucleotide-binding domain 1 ou 2
NMD	Noyau moteur dorsal du nerf vague
NOD	Non obese diabetic
NPV	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

NPY	Neuropeptide Y
NTS	Noyau du tractus solitaire
PACAP	Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PCR	Polymerase chain reaction
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-diphosphate
PKA, PKC, PKG	Protéine kinase A, C ou G
PLC	Phospholipase C
PP	Polypeptide pancréatique
PPADS	Acide pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonique
PTG / AGEs	Produits terminaux de glycation / Advanced glycation end products
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
Rim2, Rim2 α	Rab interacting molecule 2, 2 α
RIP	Rat insulin promoter
RP	Reserve pool
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium
RRP	Readily releasable pool
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SGLT2	Sodium-glucose co-transporter 2
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
SNP	Single nucleotide polymorphisme
SP	Slow potential
SUR	Sulfonylurea receptor, sous-unité du K _{ATP}
TIRF	Total internal reflection force microscopy
TTX	Tétradotoxine
vGLUT1-2	Transporteur vésiculaire du glutamate de type 1 ou 2
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide
VLDL	Very low density lipoprotein
ω -Aga IVA	ω -agatoxine de type IVA
ω -CTX GVIA	ω -conotoxine de type GVIA

INTRODUCTION

1. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE

1.1. La glycémie et l'importance de son maintien

Le fonctionnement des cellules eucaryotes repose sur l'utilisation d'ATP comme énergie principale. Si les cellules peuvent produire l'ATP grâce à des réactions de glycolyse et de respiration oxydative, elles ont pour cela besoin de sources d'énergie servant de base à cette production. Chez les mammifères, et donc chez les humains, ces sources d'énergie sont les carbohydrates aussi appelés glucides, les lipides et les protéines sources d'acides aminés, et sont apportées à l'organisme par le biais de l'alimentation. Ces nutriments, une fois digérés, sont transportés à toutes les cellules de l'organisme par la circulation sanguine pour être utilisés soit comme source d'énergie, soit comme matière première (pour la synthèse protéique ou le renouvellement des membranes par exemple), ou bien sont stockés en vue d'une utilisation ultérieure. La balance entre les dépenses et les apports d'énergie dans l'organisme définit l'homéostasie énergétique, qui est une condition nécessaire au maintien de la fonction des différents organes.

Les protéines alimentaires sont principalement utilisées comme source d'acides aminés essentiels pour la synthèse protéique par les cellules. Les protéines hépatiques et musculaires peuvent servir de source d'énergie, mais uniquement en cas de jeûne prolongé lorsque les autres nutriments viennent à manquer. Les lipides sont des nutriments essentiels qui interviennent dans la constitution des membranes cellulaires, et sont parfois à la base de la synthèse de certaines hormones (cas du cholestérol pour les hormones stéroïdes). En outre, les stocks lipidiques contenus dans le tissu adipeux constituent les principales réserves d'énergie de l'organisme. Cependant, le catabolisme des acides gras dans les cellules est un processus plutôt lent, qui de plus n'existe que dans les organismes aérobies étant donné que les réactions générant de l'ATP à partir des acides gras ont lieu dans la mitochondrie. Le glucose, en revanche, est un glucide simple qui peut être métabolisé par presque tous les organismes connus, que ce soit anaérobies par des réactions de fermentation, ou aérobies en impliquant la glycolyse, le cycle de Krebs et enfin la respiration oxydative dans la mitochondrie. Le

catabolisme du glucose étant plus simple et plus rapide que celui des autres nutriments, il s'agit donc de l'unité énergétique de base pour la majorité des êtres vivants (Randle 1964). Certains organes chez les mammifères utilisent d'ailleurs presque exclusivement le glucose (avec les corps cétoniques) comme source d'énergie, comme par exemple le cerveau ou les reins. Par conséquent, la concentration de glucose dans le sang doit être maintenue constante afin de garantir l'approvisionnement énergétique de tous les organes et ainsi leur bon fonctionnement. Chez l'Homme, les valeurs physiologiques de la glycémie varient entre 0,63 et 1,1 g/L (c'est-à-dire de 3,5 à 6,1 mM) à jeun, et ne doivent pas dépasser 1,4 g/L (7,8 mM) deux heures après le début d'un repas. Des excursions de la glycémie en dehors de cette gamme sont définies comme des hypo- ou des hyperglycémies.

L'hypoglycémie se définit par une baisse des taux sanguins au-dessous de 3,5 mM. Elle résulte d'un jeûne prolongé ou d'un exercice physique intense, mais peut également être la conséquence d'une pathologie telle qu'un insulinome, ou encore d'un surdosage d'insuline exogène dans le cadre d'un traitement du diabète. Lors de l'hypoglycémie, des mécanismes de régulation se mettent en route pour tenter de rétablir la normoglycémie. Ainsi le système nerveux parasympathique est activé en premier lieu, ce qui se manifeste par une sensation de faim, puis, si l'hypoglycémie se prolonge, l'activation du système sympathique induit plusieurs symptômes tels que tachycardie, sudation, pâleur ou encore anxiété. Par la suite adviennent des altérations du système nerveux central, avec l'apparition de troubles cognitifs et des conséquences neurologiques qui peuvent être irréversibles, et à terme conduire au coma puis à la mort si la glycémie chute en dessous de 1 mM (Seng *et al.* 1985, Brouhard 1992b, Brouhard 1992a, Heller & Ward 1993, Lacherade & Jacqueminet 2009).

L'hyperglycémie quant à elle se définit par une glycémie supérieure à 7 mM à jeun et une glycémie postprandiale (c'est-à-dire une ou deux heures suivant la prise alimentaire) dépassant les 10–11 mM (Dostou & Einhorn 2001). L'hyperglycémie provoque une augmentation des réactions de glycosylation non enzymatique, ou glycation (aussi connue sous le nom de « réaction de Maillard »), des protéines présentes dans le sang (hémoglobine, lipoprotéines). Cela tient au fait que le glucose dans le sang existe sous sa forme fermée, mais également sous sa forme ouverte, minoritaire. C'est cette forme ouverte du glucose qui peut interagir avec les protéines au cours de la glycation. Quand la glycémie augmente, la quantité de la forme ouverte du glucose augmente en proportion, de même que le nombre de réactions de Maillard. Dans les cas d'hyperglycémie prolongée, ces réactions aboutissent à la formation

de produits terminaux de glycation (PTG ou AGEs en anglais pour Advance Glycation End products), qui sont impliqués dans les mécanismes de vieillissement des tissus. Dans les diabètes sucrés, caractérisés par une hyperglycémie chronique, ces PTG s'accumulent et ce sont eux qui sont à l'origine des nombreuses complications rencontrées dans ces maladies, en provoquant la destruction de la paroi des vaisseaux sanguins ou bien leur obstruction et causant ainsi des micro- puis des macroangiopathies (Negre-Salvayre *et al.* 2009). Les diverses conséquences des diabètes sucrés seront abordées à la fin de ce chapitre.

Ainsi, les excursions aussi bien au-dessus qu'en dessous de la gamme des valeurs physiologiques de la glycémie ont de graves répercussions au niveau de l'organisme. Étant donné que les apports énergétiques par l'alimentation sont discontinus dans le temps, des déséquilibres de la glycémie peuvent survenir lors de la prise alimentaire ou suite à une période de jeun et/ou d'activité physique. L'organisme dispose donc de mécanismes de détection et de régulation qui sont mis très rapidement en œuvre lors de modifications de la glycémie. Nous allons maintenant définir quels sont les acteurs impliqués dans cette régulation de la glycémie et brièvement leur mode d'action.

1.2. Mécanismes de régulation de l'homéostasie glucidique

1.2.1. Les principaux régulateurs de la glycémie

- Les organes effecteurs et leur mode d'action

L'homéostasie glucidique étant un équilibre entre les apports et les dépenses de glucose dans l'organisme, tous les organes sont dans une certaine mesure impliqués dans sa régulation en raison de leur consommation propre d'énergie. Ainsi, le système nerveux central et les muscles squelettiques sont les plus grands consommateurs de glucose. Cependant, certains organes prennent une place plus importante dans le maintien de l'homéostasie en jouant un rôle régulateur bien spécifique (*Figure 1*).

- **Le foie** constitue la source prédominante de glucose dans l'organisme en dehors des prises alimentaires. En effet, lors d'un apport en nutriments par l'alimentation, le foie stocke le glucose sous une forme polymérisée, le glycogène, ce qui lui permet par la suite

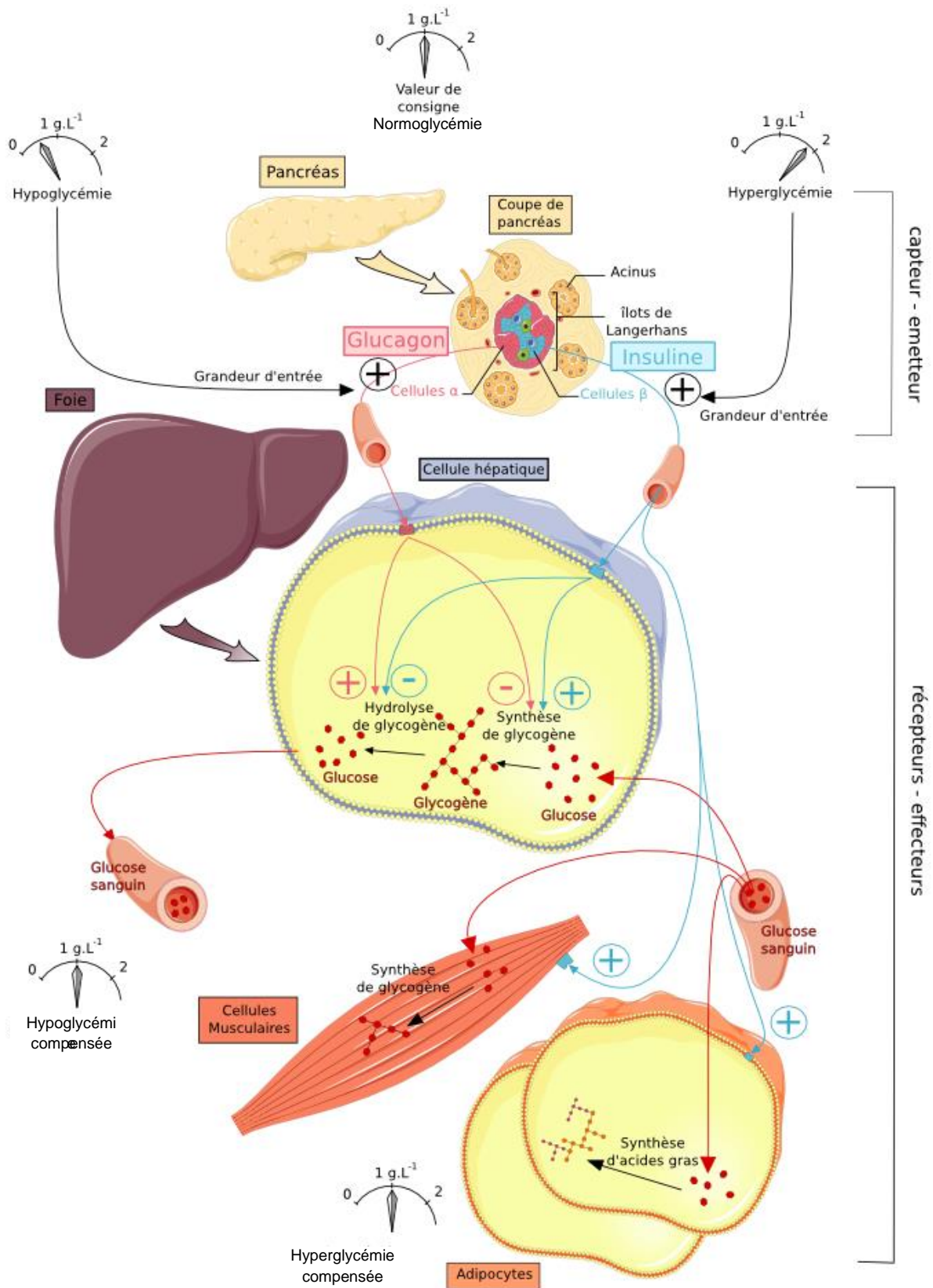


Figure 1 : Régulation de la glycémie.

Schéma récapitulant les principaux mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie glucidique.
D'après Erwan Le Fol : http://www.svt-monde.org/IMG/png/Regulation_glycemie_schema_bilan-2.png

d'approvisionner les autres organes en glucose entre deux prises alimentaires. L'équilibre entre la production et la recapture de glucose par le foie est atteinte pour une glycémie de 8,33 mM. En deçà de cette concentration, sous l'influence du glucagon (qui est une hormone hyperglycémiant sécrétée par le pancréas endocrine), le foie produit du glucose d'abord par glycogénolyse, puis par néoglucogenèse (principalement à partir d'acides gras) lorsque les stocks de glycogène sont épuisés, tandis que pour des niveaux sanguins de glucose plus élevés, l'utilisation du glucose par le foie augmente, stimulée par l'insuline hypoglycémiant (également sécrétée par le pancréas endocrine), et sert de substrat à la glycogénogenèse (Polakof *et al.* 2011). La glycémie à l'état postabsorptif (c'est-à-dire une fois que les nutriments d'un repas ont été totalement absorbés par l'organisme ; mesurée en général après un jeûne de 12 heures, comme par exemple le matin au réveil) étant d'environ 5 mM, 50% du glucose entrant dans la circulation provient de la glycogénolyse opérée par le foie. Au contraire, à l'état postprandial, qui est la période nécessaire à l'assimilation totale des nutriments issus d'un repas (d'une durée d'environ 5 à 6 heures), les apports de glucose dans la circulation sanguine ne proviennent non plus de la production hépatique mais de l'absorption intestinale des nutriments. Dans ce cas, le foie cesse sa production de glucose et devient alors consommateur de glucose (~45% du glucose circulant) en produisant du glycogène (Shrayyef & Gerich 2010). En raison de sa fonction de production de glucose endogène, le foie est l'une des cibles principales des mécanismes de régulation de la glycémie, notamment de l'insuline et du glucagon.

▪ **Le système rénal** est un producteur de glucose endogène. Bien qu'il possède de faibles réserves de glycogène, il n'est pas capable de produire du glucose par glycogénolyse en raison de l'absence de la glucose-6-phosphatase dans les cellules rénales contenant du glycogène. La production de glucose par le rein provient donc en totalité de la néoglucogenèse. Pendant la phase postabsorptive, la production rénale de glucose correspond au quart de la libération hépatique de glucose, cependant la participation rénale augmente au fur et à mesure que se prolonge le jeûne. Pendant la phase postprandiale, le rein utilise également du glucose (~10% du glucose circulant) en tant qu'énergie. En effet, de par son rôle de filtre, le système rénal met en jeu de multiples canaux ioniques et moléculaires reposant sur un mode de transport actif nécessitant de grandes quantités d'ATP. Enfin, en plus de sa production de glucose par néoglucogenèse et de sa propre utilisation de glucose, le rein peut également influencer l'homéostasie du glucose en opérant une réabsorption du glucose

contenu dans le filtrat glomérulaire, équivalent à ~180 g de glucose réabsorbé chaque jour chez des sujets sains. Ce mécanisme met en jeu des co-transporteurs sodium/glucose. Lorsque la capacité maximale de réabsorption est dépassée, comme c'est le cas lors d'hyperglycémie prononcée, le glucose contenu dans le filtrat glomérulaire ne repasse pas dans le sang, mais dans les urines, provoquant une glycosurie (Shrayyef & Gerich 2010, Gerich 2014).

- **Les muscles squelettiques** possèdent leurs propres réserves de glycogène. Cependant, à la différence du foie, ils ne sont pas capables de libérer du glucose dans la circulation. Leur réserve de glycogène est donc utilisée par les muscles eux-mêmes comme source d'énergie afin que ceux-ci puissent continuer à assurer leur fonction locomotrice. En revanche, la capacité du tissu musculaire à rapidement augmenter son utilisation de glucose en fait un acteur important dans la régulation de la glycémie, notamment juste après un repas. Cet organe est en effet le principal utilisateur de glucose en période postprandiale juste après le foie (~30% du glucose circulant). Le glucose capté par les muscles est alors soit utilisé immédiatement, soit utilisé comme substrat pour la glycogénogenèse afin d'entretenir ses réserves d'énergie. Enfin, les muscles squelettiques jouent un rôle additionnel dans la régulation de la glycémie en relargant dans la circulation sanguine des acides aminés qui seront utilisés par le foie pour la néoglucogenèse (Spargo *et al.* 1979, Yang 2014).

- **Le tissu adipeux blanc** constitue la forme de stockage majoritaire de l'énergie en surplus lors d'un apport excessif de nutriments. Bien que le tissu adipeux blanc absorbe essentiellement des lipides stockés sous forme de triglycérides au sein de la goutte lipidique des adipocytes, il utilise en partie le glucose absorbé après un repas (~5% du glucose circulant postprandial) qui entre alors dans la composition des triglycérides sous forme de glycérol-phosphate. Dans les situations où la néoglucogenèse hépatique est nécessaire (épuisement des réserves de glycogène), le tissu adipeux libère dans la circulation sanguine des acides gras libres et du glycérol qui seront utilisés par le foie en tant que substrat pour produire du glucose. En outre, le tissu adipeux blanc joue un rôle endocrine important, en sécrétant plusieurs hormones nommées adipokines, qui vont agir à plusieurs niveaux comme par exemple sur les aires hypothalamiques du système nerveux central impliquées dans la régulation de l'appétit, sur le système gastro-intestinal pour réguler la digestion, ou encore en influençant les sécrétions hormonales du pancréas endocrine, un organe qui comme nous le verrons plus tard joue un rôle crucial dans la régulation de la glycémie (Feng *et al.* 2013).

▪ **Le système nerveux** est l'un des organes dont les besoins en énergie, et notamment en glucose, sont les plus élevés : il en utilise 120 g quotidiennement, ce qui équivaut à 60–70% du métabolisme glucidique de l'organisme entier. Le cerveau ne dispose pas de ses propres réserves d'énergie, de plus, il ne peut pas utiliser les acides gras libres car ceux-ci traversent difficilement la barrière céphalo-rachidienne. Le système nerveux influence donc la glycémie par son utilisation de glucose (~15% du glucose circulant postprandial), mais également par tout un ensemble de mécanismes régulateurs intervenant à divers niveaux.

En effet, le système nerveux régule de multiples fonctions dans l'organisme, les comportements, perceptions, mouvements étant directement dirigés par cet organe. Les comportements alimentaires sont ainsi également contrôlés par le système nerveux central, qui intègre pour cela les signaux de satiété ou d'appétit provenant des organes périphériques impliqués dans la digestion ou le stockage de l'énergie, que ces signaux soient nerveux (relayés depuis les innervations sensorielles afférentes depuis le système gastro-intestinal, le pancréas, le foie...) ou hormonaux (comme par exemple les adipokines sécrétées par le tissu adipeux, l'insuline sécrétée par le pancréas endocrine ou encore les incrétines provenant de l'intestin grêle). Le cerveau est également doté de neurones sensibles aux niveaux circulants des différents métabolites (glucose, lipides, protéines), ce qui lui permet d'engager une réponse adaptative immédiate en cas de neuroglucopénie ou hypoglycémie (mécanisme appelé « contre-régulation de l'hypoglycémie » (Verberne *et al.* 2014)).

Les aires cérébrales régulant la prise alimentaire sont principalement localisées dans l'hypothalamus. Le contrôle exercé par le système nerveux sur les organes périphériques impliqués dans l'homéostasie glucidique est inconscient : il implique le système nerveux dit autonome, comportant deux voies neuronales distinctes : le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique. Des voies sensorielles sont aussi impliquées. Ces branches périphériques du système nerveux autonome disposent également de neurones sensibles au glucose qui informent directement le système nerveux central des variations métaboliques au niveau des organes clés dans la régulation de l'homéostasie énergétique, et permettent ainsi de déclencher des réponses rapides des organes effecteurs via le système nerveux (Levin *et al.* 2011, Morton *et al.* 2014).

▪ **Le pancréas** n'est pas un organe producteur de glucose, ni l'un des utilisateurs principaux. Il est néanmoins un organe indispensable dans la régulation de la glycémie. En

effet, le pancréas comporte deux parties distinctes : le pancréas exocrine qui intervient dans le processus de digestion en libérant les sucs pancréatiques dans le duodénum, et le pancréas endocrine qui produit et sécrète deux hormones essentielles directement impliquées dans le contrôle glucidique : l'insuline et le glucagon.

L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme. Elle est synthétisée, stockée puis sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques lors d'une augmentation de la glycémie. Libérée dans la circulation sanguine, l'insuline va agir au niveau de ses cibles pour diminuer la glycémie : globalement, elle inhibe la production de glucose (que ce soit la glycogénolyse ou la néoglucogenèse) au niveau du foie, des muscles et des reins, et elle stimule la captation de glucose dans les muscles et le tissu adipeux, ainsi que la glycolyse et la synthèse de glycogène. Elle a en outre un effet d'anabolisant protidique en augmentant la captation des acides aminés dans les muscles et le foie, ainsi qu'une action antilipolytique (inhibition des lipases responsables de la lipolyse) dans les adipocytes, dans lesquels elle favorise au contraire la formation de glycérol-phosphate. L'insuline induit ainsi une augmentation de la concentration des triglycérides dans le sang en favorisant la synthèse hépatique des lipoprotéines de très faible densité (Very Low Density Lipoprotein, VLDL). L'action de l'insuline sur les triglycérides est cependant double, étant donné qu'elle a également un effet inverse en favorisant la dégradation des chylomicrons et des VLDL par la lipoprotéine lipase (Cheatham & Kahn 1995). Au niveau central, l'insuline agit au niveau hypothalamique en modulant les comportements alimentaires : elle inhibe la prise alimentaire en supprimant l'expression du neuropeptide Y (NPY), un neuropeptide orexigène. Son action au niveau hypothalamique interfère également avec la contre-régulation de l'hypoglycémie et régule indirectement la production endogène de glucose par le foie (Schwartz *et al.* 1992, Obici & Martins 2010). Ainsi, en favorisant la consommation et le stockage du glucose et en inhibant la production endogène de ce nutriment, l'insuline remplit sa fonction hypoglycémiante.

Les îlots pancréatiques sécrètent également une autre hormone, le glucagon produit par les cellules α , et dont les effets sont antagonistes à ceux de l'insuline. En effet, en cas de chute de la glycémie, le glucagon exerce un effet hyperglycémiant en stimulant la glycogénolyse et la néoglucogenèse dans le foie afin de faire augmenter les taux sanguins de glucose. Le glucagon a également une action catabolique sur les protéines, en diminuant les taux sanguins d'acides aminés qui sont captés par le foie pour servir de substrat à la formation

de glycogène. Il stimule aussi la lipolyse dans le tissu adipeux ainsi que dans le foie en activant la lipase hépatique, ce qui induit l'hydrolyse des triglycérides à l'intérieur du foie, et donc une augmentation de la production d'acides gras libres et de corps cétoniques. Le rôle du glucagon est donc, en agissant ainsi sur ces cibles, d'assurer un apport immédiat de glucose dans le sang lors d'une baisse de la glycémie (Lawrence 1969). Tout comme l'insuline, le glucagon exerce des effets via le système nerveux central, en augmentant par exemple la consommation de nourriture, probablement par une modification du tonus vagal et de la vitesse de la vidange gastrique (Heppner *et al.* 2010). Cette hormone augmente également la dépense énergétique, notamment en réponse à un stress (Jones *et al.* 2012).

En plus de ces deux hormones intervenant de façon directe dans le maintien de l'homéostasie glucidique, les îlots produisent d'autres peptides tels que la ghréline, le polypeptide pancréatique ou encore la somatostatine qui ont un effet modulateur sur la sécrétion hormonale du pancréas endocrine, ainsi que des effets centraux en intervenant dans la régulation de la prise alimentaire : la ghréline stimule l'appétit tandis que le polypeptide pancréatique et la somatostatine réduisent la prise alimentaire (Begg & Woods 2013, Sobrino Crespo *et al.* 2014).

▪ **L'intestin grêle** est l'organe chargé du transfert dans la circulation sanguine des nutriments essentiels issus de l'alimentation. Il a récemment été découvert que l'intestin était capable de produire du glucose par néoglucogenèse, la production intestinale de glucose représentant 20–25% de la production de glucose endogène totale pendant le jeûne (Mithieux & Gautier-Stein 2014). Du point de vue phylogénétique, l'intestin et les cellules endocrines du pancréas faisaient initialement partie de la même structure anatomique. Ce n'est qu'au cours de l'évolution que les deux organes se sont séparés (Fujita 1991, Madsen 2007). Cependant, ils ont gardé des traits communs, comme certains facteurs de transcription, un lignage et des fonctions cellulaires très proches. Ainsi, l'intestin grêle opère, tout comme le pancréas, une régulation hormonale de la glycémie en sécrétant des hormones peptidiques nommées incrétines lors du passage du bol alimentaire dans le tractus intestinal. Ces incrétines libérées dans la circulation sanguine vont préparer les cellules β endocrines du pancréas à l'augmentation imminente de la glycémie, ayant pour effet de potentialiser la réponse sécrétoire au glucose émise par celles-ci.

Les hormones incrétines principales sont le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), libéré par les cellules de type L de l'iléum, et le glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) libéré par les cellules de type K du duodénum et du jéjunum proximal. Le GLP-1 est synthétisé à partir du même gène codant pour le glucagon mais subit des modifications post-traductionnelles différentes. Outre leur rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline, ces hormones interviennent également au niveau central dans la régulation de la prise alimentaire et en périphérie dans la régulation de l'utilisation ou de la production de glucose par les organes (Campbell & Drucker 2013).

Le GLP-1 par exemple potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β et inhibe la sécrétion de glucagon par les cellules α . Il stimule la glycogénogenèse et diminue la production de glucose endogène au niveau hépatique. Il active également la captation du glucose et des lipides par le tissu adipeux blanc, où la lipolyse est alors augmentée. Dans les muscles squelettiques, le GLP-1 stimule l'oxydation de glucose et la glycogénogenèse. Il intervient également dans la digestion en augmentant la vidange et la sécrétion gastrique. Enfin, il agit au niveau central en augmentant la satiété et régule ainsi l'appétit (Cho *et al.* 2014, Parker *et al.* 2014).

L'homéostasie glucidique résulte donc de mécanismes de régulation complexes mettant en jeu de multiples organes interagissant entre eux. Afin de réguler au mieux la glycémie, ces régulateurs doivent pouvoir en connaître la valeur à chaque instant, d'où la nécessité d'une détection efficace des variations du glucose sanguin.

- La détection du glucose

L'organisme est équipé de cellules capables de détecter les variations des nutriments, que ce soit du glucose (Thorens 2008) ou des lipides sous la forme des acides gras libres (Moulle *et al.* 2014), et dont la réponse est fonction des taux de nutriments détectés. Cette réponse constitue donc un signal qui est transmis, par le biais de signaux hormonaux, neuro-naux ou intercellulaires dans certains cas, aux organes effecteurs que nous venons d'aborder afin qu'ils adaptent leur utilisation ou production de glucose et d'acides gras à la glycémie et à la lipidémie ambiantes, contribuant ainsi au bon maintien de l'homéostasie énergétique. Les deux types de détecteurs (du glucose ou des acides gras) sont impliqués dans la régulation de la glycémie, étant donné l'influence qu'ont ces nutriments sur leur métabolisme réciproque.

Nous ne traiterons ici que des détecteurs du glucose, dont l'activité peut néanmoins, pour certains d'entre eux, être modulée par les acides gras.

- Les détecteurs de glucose les plus importants de l'organisme sont contenus dans les **îlots de Langerhans** pancréatiques, et ne sont autres que les cellules β et les cellules α , qui influent directement sur la glycémie par l'intermédiaire des hormones qu'elles sécrètent, tout en étant régulées par les taux sanguins de glucose (leur activité sécrétoire étant fonction des concentrations de glucose extracellulaire). Tout comme les neurones, ces cellules sont dites excitables car elles génèrent une activité électrique. Alors que les cellules β s'activent pour des concentrations élevées de glucose, les cellules α sont plus sensibles à des variations de glucose à des concentrations faibles (Thorens 2008). Les **cellules L et les cellules K du tractus intestinal** opèrent également une détection du glucose lors du passage des nutriments pour sécréter les incrétines (Ezcurra *et al.* 2013). Cependant, il ne s'agit pas là des seuls détecteurs de glucose dont est équipé l'organisme.

- En effet, la mesure de la glycémie en divers points stratégiques du corps se fait par le biais de **neurones gluco-sensibles**, c'est-à-dire dont l'activité électrique est modifiée lorsque la glycémie varie. En périphérie, ces neurones sont retrouvés dans le système nerveux autonome, au niveau du tube digestif. Ils interviennent dans la régulation de la prise alimentaire en influant sur la motilité intestinale, la vitesse de digestion et la vidange gastrique (Browning 2013, Mithieux 2014a). Dans le système nerveux central, les neurones sensibles au glucose se retrouvent dans plusieurs aires cérébrales. Cependant, les circuits les mieux connus sont ceux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ces neurones se répartissent en deux catégories : les neurones glucose-excités (dits GE), tout comme les cellules β pancréatiques, sont activés lors d'une hausse de la glycémie, durant laquelle leur fréquence de décharge augmente, tandis que les neurones glucose-inhibés (GI) à l'inverse seront plus actifs si la glycémie diminue, comme c'est le cas pour les cellules α pancréatiques. Ces neurones sont notamment présents dans l'hypothalamus (Oomura *et al.* 1975) qui intègre les informations nerveuses, métaboliques et hormonales en provenance de la périphérie pour réguler le comportement alimentaire et la dépense énergétique en fonction des modifications de l'homéostasie. Les capteurs situés au niveau central, notamment les GI, sont également impliqués dans la contre-régulation de l'hypoglycémie (Levin *et al.* 2011, Thorens 2014).

▪ Enfin, la veine porte hépatique constitue un site clé dans la détection du glucose étant donné qu'elle recueille le flux sanguin de tout le tube digestif et donc les nutriments issus de l'alimentation. Le **détecteur de glucose hépato-portal** intervient dans le contrôle de la prise alimentaire, et est notamment responsable de l'état de satiété suivant un repas. Lorsque la glycémie augmente dans la veine porte, ce détecteur diminue le tonus électrique des afférences nerveuses passant par le nerf vague et par la moelle épinière projetant sur les centres nerveux hypothalamiques qui régulent la prise alimentaire et le métabolisme, réduisant ainsi la prise alimentaire et augmentant la captation et l'utilisation de glucose par les organes périphériques (Hevener *et al.* 1997, Thorens 2001, Mithieux 2014b). À noter que les cellules mêmes composant ce détecteur n'ont pas encore été identifiées.

Bien qu'il existe plus d'un mécanisme pour détecter soit une augmentation soit une diminution des taux de glucose, les capteurs cellulaires du glucose expriment et utilisent souvent les mêmes outils moléculaires que ceux utilisés par la cellule β , avec notamment l'utilisation du transporteur de glucose GLUT2 (chez les rongeurs), la glucokinase, et un canal potassique membranaire sensible à l'ATP (K_{ATP}) qui permet le déclenchement d'une activité électrique lorsque le glucose est métabolisé par la cellule (Schuit *et al.* 2001, Thorens 2008, Thorens 2014). Les mécanismes de détection mis en œuvre par la cellule β seront abordés plus en détail dans le chapitre 3.

○ Les hormones peptidiques

Outre les incrétines, le système nerveux central et les hormones pancréatiques sécrétées par les îlots de Langerhans, les mécanismes de régulation de la glycémie font intervenir plusieurs autres peptides qui ont un rôle régulateur sur la prise alimentaire (Buhmann *et al.* 2014). Cependant, ces peptides influent aussi sur la sécrétion des hormones pancréatiques, notamment sur la libération d'insuline.

Parmi ceux-ci, le plus connu est certainement la leptine. Parfois appelée « hormone de la satiété », la leptine est une hormone anorexigène (c'est-à-dire impliquée dans la diminution de l'appétit) produite en majeure partie au niveau du tissu adipeux blanc, et plus faiblement au niveau de l'estomac. Elle agit sur plusieurs organes dont l'estomac et l'intestin grêle, ainsi que sur le cerveau, principalement au niveau hypothalamique afin de diminuer la prise alimentaire (Münzberg & Morrison 2014). Cette adipokine agit également sur les cellules β des

îlots de Langerhans qui en expriment le récepteur, afin d'inhiber aussi bien la biosynthèse que la sécrétion de l'insuline (Seufert 2004).

Un autre peptide impliqué dans la régulation de la glycémie est la ghréline. Il s'agit d'un peptide orexigène qui augmente l'appétit et l'adiposité. La ghréline est synthétisée au niveau de l'estomac, de l'intestin et des cellules ϵ des îlots pancréatiques. Ce peptide serait impliqué dans un mode de régulation paracrine des cellules ϵ sur les cellules β , mais son rôle exact dans la régulation de la sécrétion d'insuline n'a pas encore été éclairci (Kapica *et al.* 2006, Chabot *et al.* 2014).

L'apéline aussi est sécrétée par plusieurs organes du système digestif sur lesquels elle exerce son action puisqu'ils expriment son récepteur. L'apéline intervient également dans la régulation de la prise alimentaire, même si son rôle n'est pas clairement défini. Les taux d'apéline semblent toutefois augmenter dans plusieurs troubles métaboliques. Certaines isoformes de l'apéline inhibent la sécrétion d'insuline (Castan-Laurell *et al.* 2011).

Enfin, les orexines tirent leur nom de leur rôle stimulateur de la prise alimentaire. Ces peptides seraient de lointains dérivés de la famille des incrétines. Les orexines sont impliquées dans la régulation de la glycémie, et leurs récepteurs sont exprimés au sein des îlots de Langerhans. Cependant, leur action sur la sécrétion des hormones pancréatiques n'a pas été étudiée (Adeghate 2012).

Le rôle de ces différents peptides dans la régulation de la prise alimentaire et de l'appétit a été clairement établi. En dépit du manque de données concernant l'effet exact de ces peptides sur la sécrétion des hormones pancréatiques, ils semblent tout de même intervenir pour moduler la libération d'insuline.

1.2.2. La régulation postprandiale de la glycémie : plusieurs phases distinctes

Lors de la prise d'un repas, la glycémie augmente de façon soudaine. La cellule β nécessite donc une préparation pour faire face à cette augmentation. Après un repas, les taux plasmatiques d'insuline augmentent bien avant l'arrivée du glucose dans le sang (*Figure 2*), l'augmentation de la glycémie ne survenant que 15 minutes environ après la prise alimentaire (Bellisle *et al.* 1983). La sécrétion d'insuline est donc régulée de façon spécifique lors de la prise alimentaire afin d'anticiper l'augmentation de la glycémie et la ramener au plus vite à sa

valeur basale. Cela implique plusieurs mécanismes agissant de concert pour adapter la sécrétion hormonale pancréatique à cet événement ponctuel.

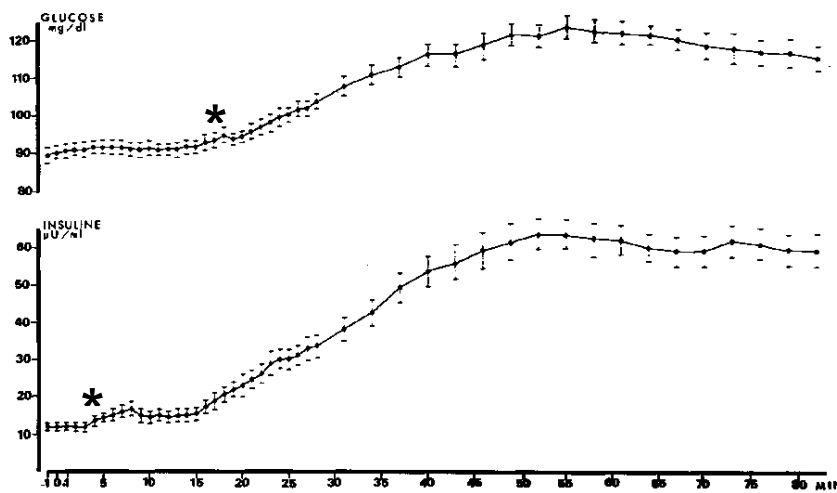


Figure 2 : Variations de la glycémie et de l'insulinémie après un repas

La nourriture a été présentée aux sujets pendant la 3ème minute de la collecte de glucose. Les étoiles indiquent le premier échantillon significativement différent de la ligne de base (les deux premiers échantillons). Alors qu'aucune modification significative de la glycémie (courbe du haut) n'est

observable avant la 17ème minute après le début du repas, une augmentation de l'insuline plasmatique (courbe du bas) apparaît dès la 4ème minute après le début de la prise alimentaire (moyenne de 42 repas \pm SEM). D'après Bellisle et al. (1983).

○ Phase céphalique : régulation nerveuse de la libération d'insuline

Le processus complexe de la régulation postprandiale de la glycémie débute avant même l'arrivée des nutriments au niveau intestinal et leur passage dans le sang : le système nerveux parasympathique active la sécrétion d'insuline dès le moment où le goût des aliments est perçu au niveau buccal. Les informations sont intégrées au niveau central puis retransmises aux îlots dont la sécrétion d'insuline est alors stimulée, avant même que la glycémie ne change. Cette sécrétion, appelée phase céphalique de la libération d'insuline, est cruciale pour la régulation de la glycémie postprandiale. En effet, grâce à la phase céphalique, une forte concentration d'insuline est libérée lors de la prise alimentaire, permettant ainsi une meilleure prise en charge du glucose absorbé. L'absence de phase céphalique entraîne d'ailleurs une intolérance au glucose (Ahrén 2000, Teff 2011).

○ Phase entéro-insulaire : l'effet incrétine

Un second mode de régulation intervient lorsque les aliments commencent à être assimilés par l'intestin. En effet, lors du passage du bolus alimentaire dans l'intestin, les cellules de l'épithélium intestinal libèrent des hormones dites incrétines. Celles-ci sont

libérées dans la circulation quelques minutes après l'ingestion des aliments. Une fois libérées, ces hormones agissent sur les îlots de Langerhans où elles vont potentialiser la sécrétion d'insuline. Cet effet potentialisateur, nommé « effet incrétine » compte pour 60–70% de la sécrétion d'insuline postprandiale (Marks *et al.* 1991, Scrocchi *et al.* 1996, Cho *et al.* 2014, Nadkarni *et al.* 2014).

- Phase insulaire

En parallèle de la phase entéro-insulaire se fait une détection de la glycémie au niveau pancréatique par les îlots de Langerhans. L'augmentation postprandiale de la glycémie induit ainsi une stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans ainsi qu'une diminution de la sécrétion de glucagon par les cellules α . Le fonctionnement de ces deux types cellulaires sera abordé au cours des chapitres 3 et 5. Dans les îlots isolés, séparés de leurs afférences nerveuses et sortis du contexte physiologique de l'organisme entier, seule la phase insulaire peut être étudiée en faisant varier les concentrations extracellulaires de glucose. En ce qui concerne les phases céphalique et entéro-insulaire, seul l'effet de l'application des incrétines ou de certains neurotransmetteurs sur l'activité des îlots, c'est-à-dire une reproduction du signal une fois arrivé au niveau de l'îlot, peuvent être explorées *in vitro*.

1.3. Dérégulation de l'homéostasie glucidique et conséquences pathologiques

1.3.1. Les diabètes sucrés : définition et épidémiologie

Le diabète sucré (ou diabète mellitus) est le désordre métabolique le plus fréquemment rencontré. Il se caractérise par une hyperglycémie chronique. Une personne est considérée comme diabétique si sa glycémie est supérieure à 7 mM à jeun (soit plus de 1,26 g/L) et dépasse les 11 mM après l'ingestion de 75 g de glucose (soit plus de 1,9 g/L). La prévalence mondiale du diabète a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie, avec plus de 592 millions de diabétiques prévus pour 2035 (*Figure 3.A*). En France par exemple, plus de 3,5 millions de personnes (soit 5,6% de la population) ont reçu un diagnostic de diabète en

2012, avec une progression annuelle de 5,7% dans le nombre de diagnostics (Guariguata 2013). Le diabète sucré est une maladie grave et actuellement incurable qui continue à causer des millions de morts chaque année (*Figure 3.B*). Elle se manifeste sous deux formes principales : le diabète de type 1 et le diabète de type 2, ainsi que sous des formes plus rares de diabètes monogéniques.

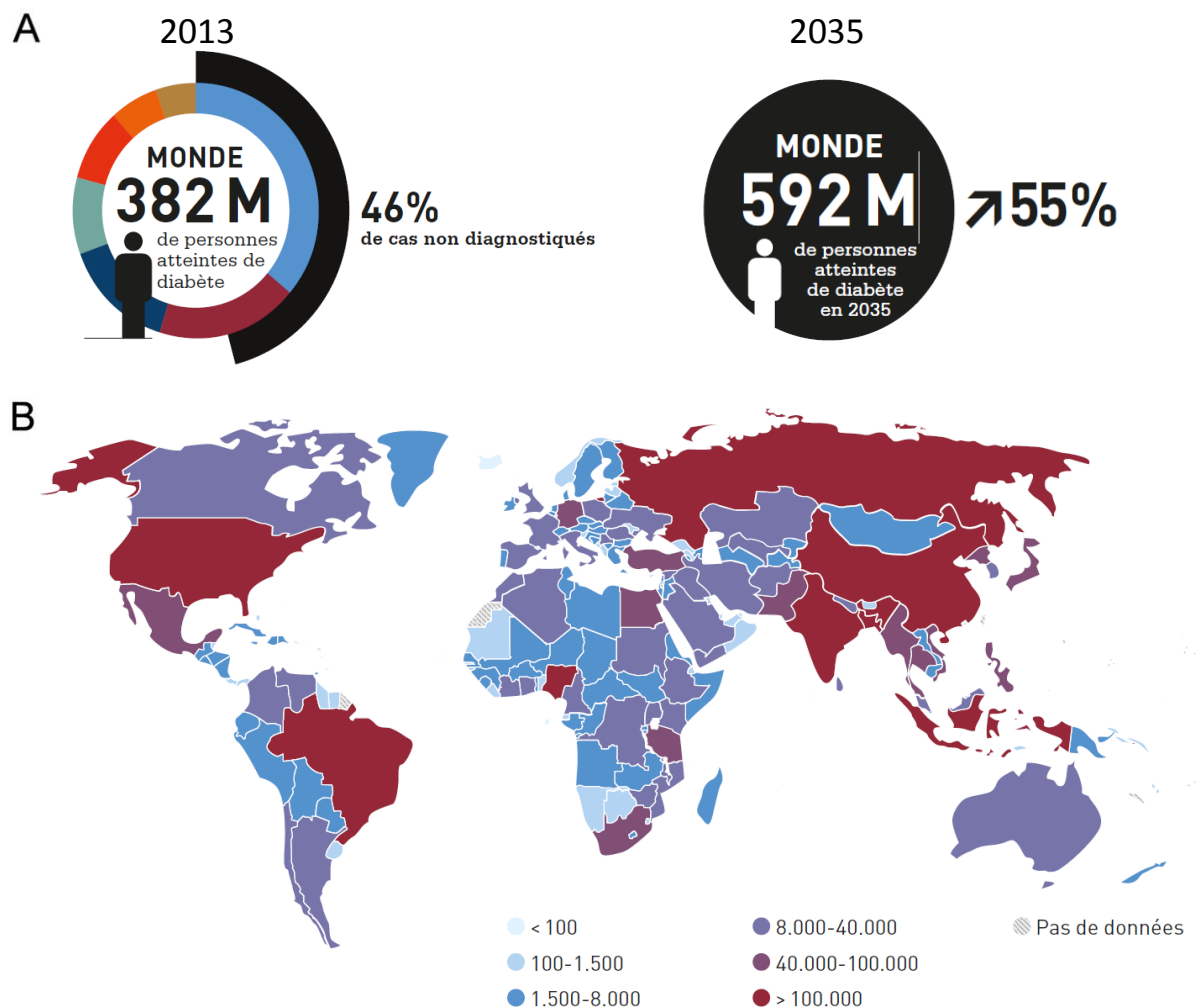


Figure 3 : Diabète, prévalence et mortalité.

A : Prévalence mondiale du diabète en 2013 et estimations pour 2035. **B** : Cartographie du nombre de décès imputables au diabète dans le monde. D'après l'Atlas du Diabète de la FID, 6^{ème} édition. http://www.idf.org/sites/default/files/FR_6E_Atlas_full.pdf

Le diabète de type 2 (DT2), autrefois appelé diabète non-insulinodépendant, est le plus répandu. Il associe un déficit de la sécrétion d'insuline et une insulino-résistance dans les organes cibles de l'hormone, sans qu'il soit clairement déterminé quel est le facteur premier dans l'apparition de la pathologie. Sa prévalence augmente avec l'âge et il touche plus souvent les hommes que les femmes. Plus de 60% des patients atteints de DT2 sont obèses (dans ce cas précis, on parle de syndrome métabolique chronique) (Fonseca & John-Kalarickal 2010).

Le diabète de type 1 (DT1), est causé par la réduction de la masse β -pancréatique suite à attaque auto-immune médiée par les lymphocytes T s'infiltrant au sein des îlots. En dépit de la subsistance d'une très faible proportion des cellules β , celle-ci n'est pas suffisante pour compenser l'insulinopénie causée par l'attaque auto-immune, d'où le nom de diabète insulinodépendant qui désignait autrefois cette maladie. Le DT1 concerne 5–10% de tous les cas de diabètes, et se manifeste chez des sujets plus jeunes que dans le DT2 (Ali 2010).

Jusqu'à récemment, le DT2 et le DT1 étaient considérés comme clairement distincts. Cependant, il apparaît que des formes intermédiaires ou mixtes entre ces deux formes de diabètes existent, et dans lesquels sont retrouvés des gènes de prédisposition à la fois pour le DT1 et pour le DT2. Avec l'amélioration des méthodes de caractérisation des phénotypes retrouvés chez les patients diabétiques, la gamme de ces formes hybrides de diabètes devrait encore se diversifier dans le futur (Tuomi *et al.* 2014).

1.3.2. Complications pathologiques

L'hyperglycémie chronique qui caractérise les diabètes sucrés cause de nombreuses complications. En effet, les produits terminaux de glycation, comme évoqués plus tôt, endommagent les vaisseaux sanguins, causant des microangiopathies et des macroangiopathies. Les microangiopathies sont à l'origine de l'apparition de rétinopathies, qui sont la première cause de cécité dans les pays industrialisés (Hammes *et al.* 2011). Le système rénal est affecté, causant des néphropathies (Berbel *et al.* 2011), et les neuropathies sont également fréquentes. Les macroangiopathies touchent les extrémités des membres et sont la première cause d'amputation non-traumatique dans les pays développés. Enfin, les maladies cardiovasculaires sont également une des complications courantes du diabète, contribuant à la morbidité.

té élevée de la maladie (Falciglia 2007) (Jellinger 2007). Chez les patients souffrant de DT1 (ou les patients DT2 traités par insulinothérapie), les risques d'hypoglycémie ponctuelle (et donc les complications associées) sont également élevés, en raison d'un surdosage de l'insuline injectée par le patient, souvent par peur de ne pas réussir à diminuer de façon effective la glycémie avec les doses recommandées par le médecin.

1.3.3. Traitements existants

Il n'existe pas, actuellement, de traitement capable de guérir le diabète. Les options thérapeutiques actuelles permettent seulement de retarder et diminuer l'intensité des complications engendrées par la maladie. La mesure la plus efficace quel que soit le type de diabète considéré est une bonne hygiène de vie, comprenant un régime alimentaire sain et de l'exercice physique.

- Traitements actuels du diabète de type 2

Les patients DT2 chez lesquels les cellules β sont encore capables de sécréter de l'insuline reçoivent en général des traitements pharmacologiques. Plusieurs médications basées sur des modes d'action distincts existent. Les sulfonylurées, comme le glibenclamide par exemple, sont des secrétagogues : ces molécules agissent directement au niveau de la cellule β pour augmenter sa sécrétion. Les analogues du GLP-1, comme le liraglutide, vont mimer l'effet incrétine afin de potentialiser la sécrétion d'insuline chez le patient. Une autre option pour augmenter l'effet incrétine est d'utiliser des inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), une enzyme dégradant les incrétines, afin d'augmenter la disponibilité et l'action de ces dernières au niveau des îlots (exemples : la sitagliptine, la vildagliptine ou encore la linagliptine).

D'autres substances auront pour objectif au contraire de diminuer le glucose par d'autres voies que la sécrétion d'insuline, comme par exemple la metformine, traitement médicamenteux le plus courant, qui va diminuer la résistance à l'insuline des tissus cibles tout en diminuant la production hépatique de glucose, contribuant à son effet hypoglycémiant, ou encore les inhibiteurs du co-transporteur sodium/glucose de type 2 (Sodium/Glucose co-Transporter 2 – SGLT2), transporteur responsable de 98% de la réabsorption glucose au niveau rénal (exemple : la dapagliflozine ou la canagliflozine). Souvent, deux médications repo-

sant sur des modes d'action différents sont combinés, comme par exemple un analogue du GLP-1 couplé à un inhibiteur de la DDP-4 (Tomkin 2014) (*cf.* également les recommandations de la Société Française d'Endocrinologie et de la Haute Autorité de Santé de janvier 2013).

Cependant, au fur et à mesure de la progression de la maladie, le dysfonctionnement des cellules β doit peu à peu être compensé par une supplémentation en insuline exogène. Certaines études recommandent l'utilisation de l'insuline dans le traitement du DT2 pas uniquement en dernier recours comme cela a souvent été le cas jusqu'à présent, mais également plus précocement et tout au long de la prise en charge de la maladie (Moghissi & King 2014).

Enfin, la chirurgie bariatrique est de plus en plus utilisée chez les patients présentant un DT2 et une obésité. Il s'agit d'une forme de chirurgie gastro-intestinale mise au point initialement pour atteindre et maintenir une perte de poids substantielle, et qui est surtout utilisée dans les cas d'obésité morbide. Cette approche chirurgicale, la seule dans le traitement du DT2, a montré d'impressionnants résultats dans la normalisation de la glycémie (avec une augmentation de la sécrétion d'insuline et une réduction de l'insulinorésistance) et dans la prévention des complications liées au syndrome métabolique (Dixon *et al.* 2012, Tomkin 2014).

- Traitements actuels du diabète de type 1

Les patients souffrant de DT1 dépendent quant à eux entièrement de l'insulinothérapie pour réguler leur glycémie. Depuis la découverte de l'insuline par Banting et Best en 1922, de nombreuses insulines exogènes ont vu le jour, mais toutes ou presque reposent sur un mode d'administration par injection, et les patients doivent fréquemment mesurer leur glycémie à l'aide d'un lecteur glycémique afin de savoir quand et quelle dose d'insuline ils doivent s'administrer pour ramener leur glycémie dans la gamme physiologique.

Des efforts considérables ont été et sont toujours déployés afin de développer une régulation automatisée de la glycémie, c'est-à-dire un pancréas artificiel. L'appareillage actuel repose sur des capteurs de glucose implantables effectuant un suivi continu de la glycémie (ou « continuous glucose monitoring ») du patient, couplés à l'utilisation de pompes à insuline qui infusent les doses adéquates d'insuline de façon programmée ou automatiquement pilotée par des algorithmes à partir des valeurs de glycémie recueillies par le capteur implanté. Cepen-

dant, ce système ne fonctionne pour le moment pas en boucle totalement fermée, et nécessite encore une intervention du patient afin de garder un contrôle glycémique optimal. Cela est principalement dû à la difficulté d'obtenir un algorithme capable de calculer et d'anticiper la demande en insuline du patient à partir des taux de glucose uniquement (Cobelli *et al.* 2011, Aathira & Jain 2014).

Certains patients DT1 peuvent bénéficier d'une greffe d'îlots de Langerhans ou bien de pancréas provenant de donneurs sains pour pallier à la destruction auto-immune de leurs propres cellules β . La transplantation est proposée aux patients présentant un très mauvais contrôle sur leur glycémie, et sujets à de fréquents épisodes d'hypoglycémie dont ils ne savent pas reconnaître les symptômes. La transplantation d'un pancréas complet permet au patient d'acquérir une indépendance totale vis-à-vis de l'insuline exogène. Cependant, il s'agit d'une chirurgie lourde, souvent associée à des complications post-opératoires telles que le développement de fistules. Étant donné que seule la fonction endocrine est déficiente dans le diabète, la transplantation de l'organe entier, alors que seuls 2–3% de celui-ci (à savoir la partie endocrine) sont nécessaires chez le receveur, représente un rapport bénéfices/risques faible. Dans les cas d'atteinte rénale chez le patient receveur, une double greffe reins-pancréas est opérée (Jahansouz *et al.* 2011).

La greffe d'îlots est, elle, une procédure facile du point de vue technique : la préparation d'îlots issus des pancréas de 1 à 3 donneurs est directement injectée au receveur, le plus souvent au niveau de la veine hépato-portale. Ce type de greffe n'est donc pas associé à une forte morbidité relative à l'acte de transplantation. Cependant, afin d'obtenir une insulino-indépendance chez le receveur après l'opération, les pancréas de 3 donneurs en moyenne sont nécessaires pour transplanter un unique receveur, en raison du fort taux de perte des îlots suite à la greffe. Par conséquent, cela limite le nombre de patients pouvant bénéficier de cette intervention. Le recours à la greffe et le choix de la méthode utilisée (pancréas entier ou infusion d'îlots) dépend des caractéristiques du patients d'une part (insulinopénie uniquement, ou associée avec une défaillance rénale), mais relève également de la volonté du patient et de son ressenti face aux bénéfices qu'il peut en retirer par rapport aux risques encourus (McCall & Shapiro 2012, Aathira & Jain 2014).

○ Alternatives thérapeutiques en cours de développement

Ainsi, il n'existe que peu d'options thérapeutiques pour traiter le diabète de type 1. Des études sont donc menées afin de développer des méthodes alternatives à celles existantes. De grands efforts sont notamment consacrés à l'étude de la différenciation de cellules souches en cellules β par l'activation des facteurs de transcription spécifiques au lignage des cellules β (Halban 2004). De plus, les cellules endocrines montrent une grande plasticité et peuvent ainsi se différencier vers un état de cellule progénitrice puis se redifférencier vers un autre type cellulaire endocrine. Ainsi, certaines études ont montré que les cellules β humaines, de manière inattendue, pouvait spontanément se transdifférencier en cellules α *in vitro* (Spijker *et al.* 2013). De même, il a été observé *in vivo* qu'après une destruction presque totale des cellules β induite expérimentalement, les cellules α ou δ subissent une reprogrammation spontanée vers l'état de cellules β en se mettant à produire de l'insuline (Chera *et al.* 2014). La conversion des cellules α en cellules β en particulier a déjà été montrée à plusieurs reprises, et la transdifférenciation de cellules pancréatiques exocrines, plus précisément de cellules ductales, en cellules β a aussi été montrée *in vitro* (Avolio *et al.* 2013). Enfin, d'autres pistes envisagées sont la transdifférenciation en cellules β des cellules intestinales et des hépatocytes qui partagent avec les cellules β leur origine endodermale, ou encore la formation de nouvelles cellules à partir de cellules β adultes (néogenèse) par l'utilisation de certains facteurs tels que les analogues du GLP-1 (exendine), l'Epidermal Growth Factor (EGF) et la gastrine (Minami & Seino 2013, Orlando *et al.* 2014). Reste à déterminer si ces approches sont applicables *in vivo* chez l'être humain.

Une autre voie thérapeutique envisagée est la thérapie génique, c'est-à-dire modifier des cellules non β chez le patient par l'utilisation de transgènes insérés par le moyen de vecteurs viraux, afin que celles-ci produisent et sécrètent de l'insuline (Nett *et al.* 2003). La problématique de cette approche est de trouver un type cellulaire exprimant la machinerie enzymatique permettant de sécréter l'insuline, ainsi que la capacité à détecter les taux circulants de glucose. À l'heure actuelle, les cellules K de l'intestin sont la cible privilégiée, ayant montré une sécrétion d'insuline glucose-dépendante au cours d'expériences menées chez la souris (Corbett 2001).

Dans le DT1, l'insuline est reconnue comme un antigène par le système immunitaire qui s'attaque donc aux cellules β . De nombreux efforts sont donc conduits afin de développer

des thérapies agissant au niveau du système immunitaire à un stade précoce du développement de la maladie, afin de préserver la masse des cellules β encore présentes. L'utilisation des immunosuppresseurs n'a pas montré de résultats concluant au niveau clinique. Une autre approche envisagée est la thérapie tolérogène, notamment la thérapie antigénique, qui vise à rendre l'antigène, c'est-à-dire l'insuline dans le cas du DT1, acceptable du point de vue du système immunitaire, en l'introduisant dans l'organisme par une voie qui ne déclenche pas la réponse immunitaire (par l'intermédiaire des muqueuses par exemple). Cette démarche a montré des résultats positifs chez la souris NOD (Non Obese Diabetic mouse) chez laquelle les infiltrations lymphocytaires au sein des îlots ont fortement diminué suite à une administration orale d'insuline porcine. Bien que les essais chez l'Homme n'aient pas encore donné de résultats probants, cette approche thérapeutique garde un fort potentiel d'application clinique, car le dosage ou la formulation de l'insuline administrée peuvent encore être optimisés pour une meilleure efficacité (Coppieters *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Smilek *et al.* 2014).

2. LE PANCRÉAS ENDOCRINE

2.1. *Le pancréas : un organe, deux fonctions*

Comme abordé brièvement dans le chapitre 1, le pancréas joue un rôle central dans la régulation de la glycémie. Cela est d'ailleurs illustré par la conservation de cet organe au cours de l'évolution, étant donné qu'on le retrouve chez tous les vertébrés. Chez l'homme, cette glande est située profondément dans l'abdomen, derrière l'estomac, en avant et au-dessus des reins, et communique avec le tube digestif par l'ampoule de Vater et la papille d'Oddi. Le pancréas humain mesure 15 à 20 cm de long pour 3,8 cm de large environ et 1,3 à 2,5 cm d'épaisseur, et pèse de 45 à 120 g. Il comporte 4 segments : la tête (partie la plus large qui s'enchaîne à l'intérieur du cadre duodénal), l'isthme (qui sépare la tête du corps, en contact avec la veine portale), le corps (antérieur à l'aorte) et la queue (se finissant près du hile de la rate). Sa vascularisation artérielle est assurée par l'artère gastroduodénale et l'artère splénique (formant le tronc cœliaque) ainsi que l'artère mésentérique supérieure. Le retour veineux se fait par les veines pancréatico-duodénales inférieure et supérieure qui se déversent dans la veine porte par l'intermédiaire des veines splénique et mésentérique. Il reçoit une innervation sympathique et parasympathique par des branches du plexus solaire et par le nerf vague (Pandol 2011, Netter 2014). Le pancréas remplit deux fonctions distinctes séparées anatomiquement : une fonction exocrine et une fonction endocrine (*Figure 4*).

La fonction exocrine du pancréas est remplie par les acini pancréatiques et les canaux excréteurs, qui composent le parenchyme exocrine du pancréas. Le pancréas exocrine intervient dans la digestion en excréant des sucs digestifs. Ces sucs sont composés d'enzymes (protéases, lipases, amylases, ribonucléases et désoxyribonucléases) produites par les cellules glandulaires constituant la paroi des acini, et qui hydrolysent les sucres, protéines et lipides en substances simples assimilables par l'intestin. Les sucs comportent également des sels alcalins (bicarbonates NaHCO_3) émis par les cellules épithéliales formant la paroi des canaux excréteurs, dont le rôle est de neutraliser l'acidité du chyme stomacal fraîchement arrivé dans le duodénum. La sécrétion enzymatique des acini et l'excrétion alcaline des canaux excréteurs forment ensemble le suc pancréatique qui est déversé par le canal pancréatique (aussi appelé

canal de Wirsung) dans l'ampoule de Vater puis dans le duodénum (Pandol 2011).

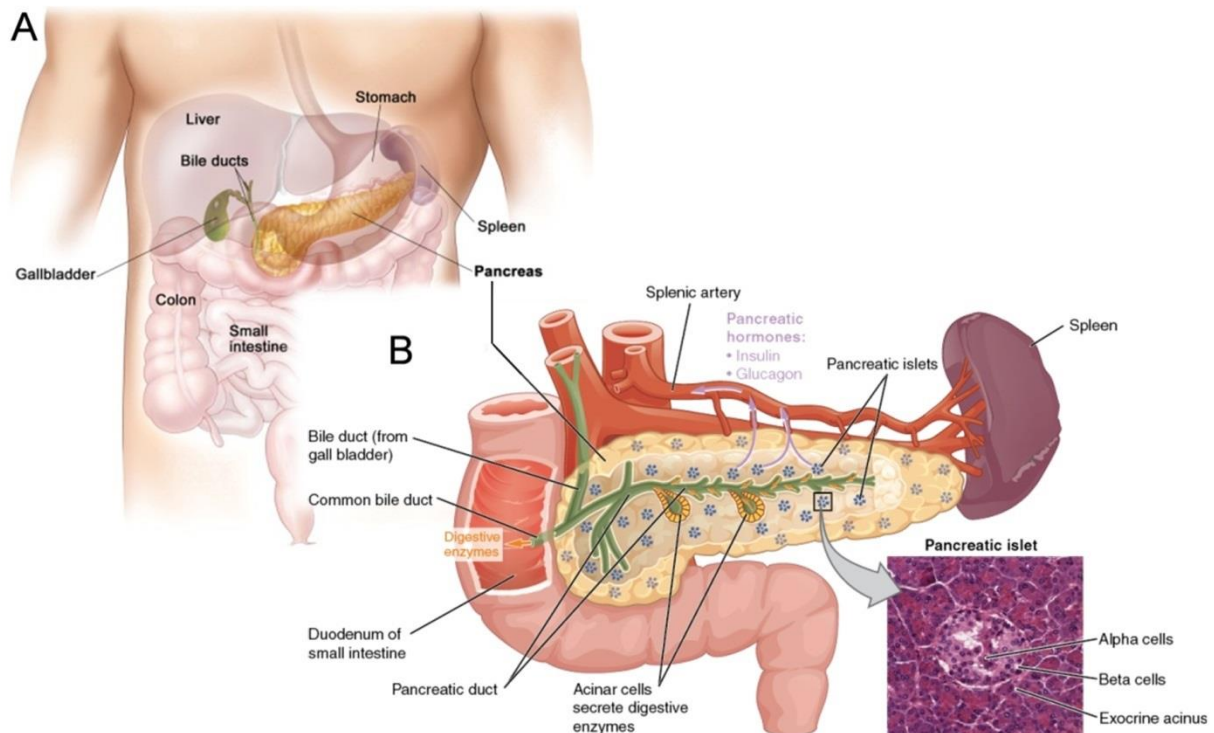


Figure 4 : Localisation et anatomie du pancréas humain.

A : Localisation du pancréas (en jaune) dans la cavité péritonéale. D'après Terese Winslow, originellement pour le National Cancer Institute, 2009. http://thebiliproject.org/wp-content/uploads/2012/09/hepatsystem_web.jpg. **B :** Anatomie fonctionnelle du pancréas: les îlots de Langerhans impliqués dans la sécrétion endocrine du pancréas sont dispersés dans le parenchyme exocrine composé des acini et des canaux excréteurs qui produisent les sucs pancréatiques digestifs. Le micrographe histochimique d'une coupe de pancréas présenté en encart montre la différence de structure cellulaire d'un îlot par rapport au tissu exocrine environnant (M.O., grossissement x760). D'après Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013.

Sa fonction endocrine confère quant-à-elle toute son importance au pancréas dans le maintien de l'homéostasie glucidique, puisque le pancréas endocrine sécrète la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme : l'insuline, ainsi que de multiples autres facteurs intervenant dans la régulation de la glycémie. La production de sucs enzymatiques par le pancréas a posé des difficultés majeures dans l'extraction de l'insuline, procédé qui n'a pu être réalisé qu'en 1922, bien que l'existence d'une substance endocrine produite par le pancréas ait été établie dès la fin du XIX^e siècle. De nos jours, l'isolation des îlots de Langerhans, micro-organes

endocrines du pancréas, demeure techniquement difficile en raison de la nécessité de préserver ceux-ci de l'action digestive des sucs enzymatiques produits par le pancréas exocrine. Nous allons maintenant voir les étapes majeures de l'Histoire de la découverte de la fonction endocrine du pancréas, ainsi que l'anatomie du pancréas endocrine.

2.2. La découverte du rôle endocrine du pancréas

La découverte du rôle endocrine du pancréas est intimement liée à la recherche sur le diabète au cours de l'Histoire. Des écrits médicaux chinois datant de 4000 ans avant J.-C. ainsi que des papyrus de l'ancienne Égypte indiquent que la condition diabétique était déjà rencontrée à l'ère préhistorique. Cependant, jusqu'à la moitié du XX^e siècle, le pronostic vital pour les patients souffrant de cette condition n'était pas meilleur qu'à l'époque de ces premières descriptions de la maladie. Il faudra attendre la fin du XVIII^e siècle pour que l'origine pancréatique du diabète soit suggérée pour la première fois, lorsque Thomas Cawley observa en 1788 le développement d'un diabète chez un patient présentant des blessures pancréatiques (des cas similaires ont également été décrits entre autres par Richard Bright en 1833, Claude Bernard en 1855 et Étienne Lancereaux en 1877).

La confirmation expérimentale de cette observation ne sera apportée qu'un siècle plus tard, en 1889 à Strasbourg, par les travaux d'Oscar Minkowski et Joseph von Mering, qui cherchaient alors à montrer l'implication des enzymes pancréatiques dans la lyse des acides gras. Pour cela, ils réalisèrent une pancréatectomie chez le chien et constatèrent avec surprise l'apparition d'une polyurie chez l'animal. Minkowski fit alors le rapprochement avec les symptômes similaires du diabète et, ayant mesuré le taux de sucre dans les urines révélant une glycosurie, conclut au développement de cette pathologie chez ce chien désormais dépourvu de pancréas. Minkowski et von Mering montrèrent de plus, par des expériences de ligature du canal pancréatique aboutissant à la dégénérescence du tissu exocrine du pancréas (technique développée par Claude Bernard quelques années plus tôt), que l'absence de la fonction exocrine digestive du pancréas n'entraînait pas de diabète, suggérant alors la production d'une autre substance aux propriétés antidiabétiques par le pancréas.

Ces résultats furent confirmés en 1893 par Édouard Hédon, chercheur français à Montpellier, qui montra en outre que de petites portions du pancréas suffisaient à assurer un effet antidiabétique, la pancréatectomie totale étant nécessaire au développement d'un diabète. En effet, il observa que des chiens pancréatectomisés auxquels avaient ensuite été greffés de petites portions de pancréas en sous-cutané ne développaient pas de diabète, celui-ci n'apparaissant qu'après le retrait des greffons, révélant ainsi la nature endocrine de la substance produite par le pancréas. La même année, le scientifique français Gustave-Édouard Laguesse suggéra que les petits amas cellulaires de tissu pancréatique décrits par le pathologiste allemand Paul Langerhans en 1869 pendant son doctorat dans l'équipe de Rudolf Virchow à Berlin, étaient l'origine de la présumée substance impliquée dans le contrôle de la glycémie et il les renomma « îlots de Langerhans ». Cette substance sera renommée « insuline » par le médecin belge Jean de Mayer en 1909.

Plusieurs scientifiques cherchèrent à isoler le composant actif de la sécrétion endocrine du pancréas. Les premiers furent John Rennie et Thomas Fraser en 1902, à Aberdeen (Ecosse), qui produisirent à partir du pancréas endocrine de cabillaud un extrait qui, injecté chez le chien, entraînait sa mort probablement à cause d'une sévère hypoglycémie. En 1907, le médecin allemand Georg Ludwig Zülzer injecta un extrait pancréatique, l'« Acomatol », à un chien pancréatectomisé avec pour effet une diminution de la glycosurie et une augmentation du pH sanguin. Nicolae Constantin Paulescu, professeur en médecine et physiologie à Bucarest en Roumanie, parvint également en 1916 à produire un extrait aqueux de pancréas de bœuf, aux effets hypoglycémiant, qu'il nomma « pancréine ». En 1921-1922, Frederick Grant Banting et Charles Best, travaillant dans l'équipe du professeur en physiologie John J. R. MacLeod à Toronto, mirent au point une méthode d'isolation des îlots de Langerhans basée sur la ligature du canal pancréatique, et l'extraction de la substance active antidiabétique des îlots qu'ils nommèrent « isletine », renommée plus tard « insuline » par MacLeod, selon le terme introduit par Jean de Mayer en 1909. Les premiers tests de la substance, administrée chez le chien diabétique, montrèrent son effet hypoglycémiant avec une diminution de la glycosurie. En 1922, la méthode d'extraction et de purification fut améliorée avec l'aide du biochimiste James Collip, aboutissant au premier test clinique de l'extrait pancréatique raffiné, conduit avec succès sur un patient diabétique de type 1, Leonard Thompson, et la même année aux débuts de la production et commercialisation de l'insuline par la compagnie Eli Lilly pour le traitement du diabète (Zajac *et al.* 2010).

2.3. L'îlot de Langerhans : un micro-organe à part entière

Le pancréas endocrine, en dépit de son importance vitale pour l'organisme puisque lui-seul produit et sécrète l'insuline, ne représente que 1 à 2% de la masse pancréatique totale. Il se présente sous forme d'amas cellulaires disséminés au sein du parenchyme exocrine, les îlots de Langerhans. Ceux-ci sont de véritables micro-organes dont la fonction spécifique est la régulation de la glycémie, et qui en tant que tels possèdent une structure cellulaire bien déterminée, une vascularisation ainsi qu'une innervation propres (Brissova & Powers 2008, In't Veld & Marichal 2010).

2.3.1. Composition et organisation cellulaire

Les îlots se présentent sous forme d'amas cellulaires, de taille hétérogène pouvant varier de regroupements de 2–3 à plusieurs milliers de cellules, pour un diamètre de 140 μm en moyenne chez l'Homme. Ces amas sont en partie entourés d'une fine capsule de collagène et de cellules gliales, les séparant du tissu exocrine environnant, et qui est variable selon les îlots considérés (Brissova & Powers 2008, In't Veld & Marichal 2010).

On retrouve 5 types de cellules endocrines dans les îlots, chacun spécialisé dans la sécrétion d'une hormone. Les cellules β majoritaires sécrétant l'insuline et les cellules α sécrétant le glucagon sont les deux types cellulaires les plus présents. Ils seront décrits plus en détail dans les chapitres et sous-chapitres qui leur sont consacrés. Les cellules δ constituent le troisième type cellulaire le plus rencontré et sécrètent la somatostatine, une hormone peptidique inhibitrice de la sécrétion d'insuline et de glucagon. Les cellules PP, qui tirent leur nom du polypeptide pancréatique qu'elles produisent, et les cellules ϵ qui sécrètent de la ghréline sont quant à elles minoritaires (In't Veld & Marichal 2010). Le polypeptide pancréatique joue un rôle de régulation de la sécrétion exocrine du pancréas, et la ghréline inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Yada *et al.* 2014). Si chaque type cellulaire est spécialisé dans la production d'une hormone particulière, chacun d'eux libère également d'autres facteurs peptidiques, comme par exemple la cellule β qui libère entre autre du VGF (Rindi *et al.* 2007) en plus de l'insuline.

L'organisation de ces différents types cellulaires au sein de l'îlot varie selon l'espèce considérée (Wieczorek *et al.* 1998, Brissova *et al.* 2005). Chez les rongeurs, modèles les plus largement utilisés dans l'étude des îlots, on retrouve un cœur de cellules β entouré d'un

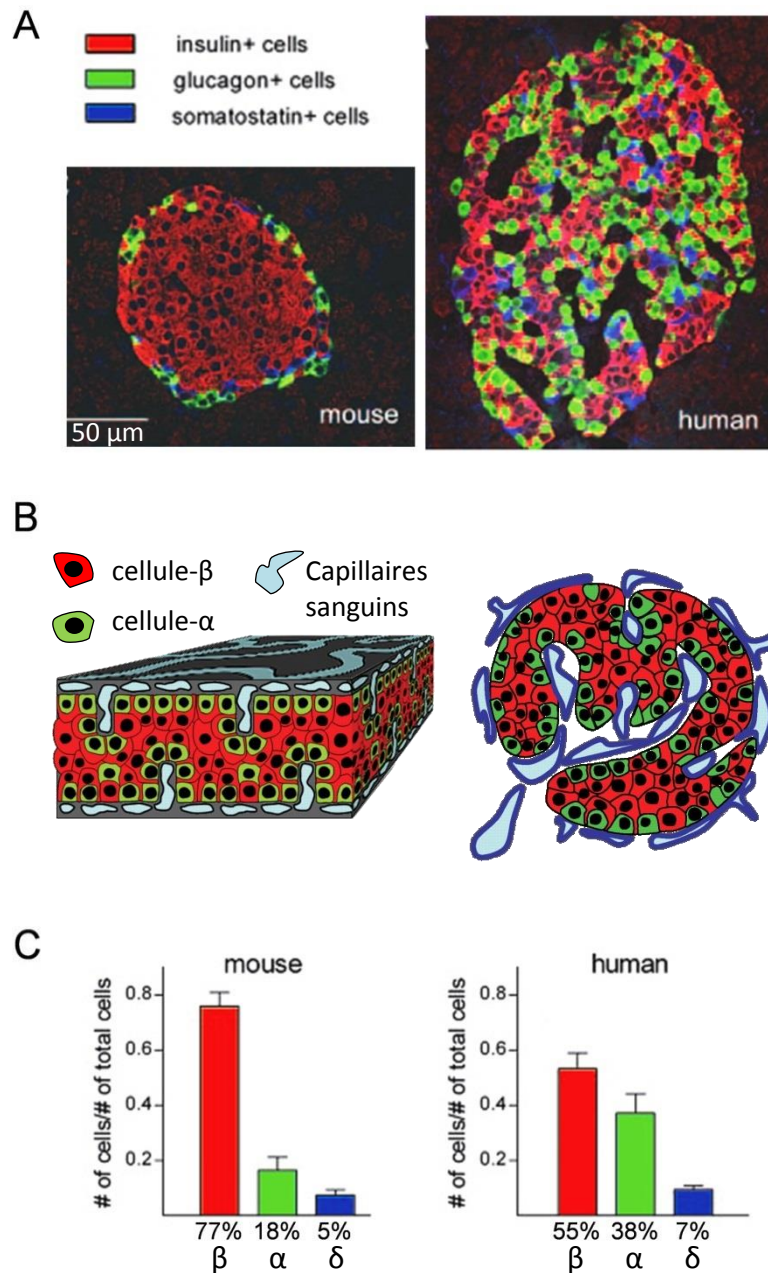


Figure 5 : Différences inter-espèces dans l'anatomie des îlots de Langerhans.

A : Clichés confocaux de sections pancréatiques immuno-marquées montrant des îlots de Langerhans de souris (à gauche) et humain (à droite).

B : Modèle de l'organisation cellulaire et vasculaire dans les îlots humains. À gauche, les cellules α (en vert) et β (en rouge) réparties dans la structure tri-laminaire dépliée, longée sur ses deux faces par les vaisseaux sanguins (en bleu). À droite, l'épithélium endocrine tri-laminaire est replié autour des capillaires sanguins pour former l'îlot.

C : Comparaison de la composition cellulaire des îlots murins et humains. Les îlots humains présentent un plus grand nombre de cellules glucagon-positives et moins de cellules insulino-positives (n=3 souris et 5 humains ; moyenne+SEM).

A et C d'après Cabrera *et al.* (2006). **B** d'après Bosco *et al.* (2010).

manteau composé des cellules non β situées en périphérie de l'îlot (Orci & Unger 1975). Cependant, dans certaines autres espèces chez lesquelles les îlots sont de plus grande taille, comme chez l'Homme, cette organisation pose problème du point de vue de la vascularisation et n'a pas été conservée. Ainsi, dans les îlots humains, à première vue, les différents types cellulaires sont répartis de façon plus homogène sans organisation apparente (*Figure 5.A*) (Cabrera *et al.* 2006). Cependant, certains investigateurs ont mis en évidence une organisation lobulaire des îlots autour des capillaires sanguins, chaque lobule possédant la structure en

cœur-manteau similaire à celle des îlots plus petits des rongeurs (Erlandsen *et al.* 1976).

En réalité, les cellules endocrines forment une sorte d'épithélium tri-laminaire dont la strate centrale est composée de cellules β , entourée de part et d'autre de couches de cellules endocrines tous types confondus. Cet épithélium est replié sur lui-même autour des capillaires sanguins, apparaissant ainsi sous forme de lobules sur les représentations de l'îlot en coupe (*Figure 5.B*) (Bosco *et al.* 2010). Cependant, la micro-anatomie des îlots isolés peut varier de celle décrite dans ces études morphométriques réalisées sur coupes pancréatiques, qui semble organisée autour des capillaires sanguins. En effet, la vascularisation est détruite durant la culture des îlots isolés, modifiant ainsi leur cytoarchitecture. L'étendue de la différence morphologique entre les îlots *in situ* et les îlots isolés n'a pas été étudiée, mais il convient de garder à l'esprit ces changements dans le cadre d'une étude réalisée sur îlots isolés.

Les îlots humains comportent moins de cellules β (environ 55%) et plus de cellules α (en moyenne 38% et parfois jusqu'à la moitié des cellules d'un îlot) que les îlots de souris qui sont eux constitués en moyenne de 77% de cellules β et 18% de cellules α (*Figure 5.C*) (Cabrera *et al.* 2006). Cette différence d'organisation entre îlots humains et murins a une répercussion physiologique sur leur fonctionnement car les cellules endocrines communiquent entre-elles par différentes interactions cellule-cellule telles que les mécanismes de régulation autocrines et paracrines (*cf.* chapitre 5) et les jonctions communicantes (*cf.* chapitre 6). Cabrera *et al.* (2006) ont en effet démontré l'existence de différences fonctionnelles entre les îlots humains et les îlots de souris, avec une réponse calcique moins coordonnée et s'activant pour des concentrations de glucose moins élevées dans les îlots humains que dans les îlots de souris.

2.3.2. Vascularisation

Les îlots sont des micro-organes richement vascularisés. Ils reçoivent en effet 5 à 15% du flux sanguin pancréatique total, et sont dotés d'un réseau capillaire 5 fois plus dense que celui du tissu exocrine. Les capillaires présents dans les îlots sont également plus longs et ont une paroi plus fine comprenant plus de fenestrations que celle des capillaires du tissu exocrine (Henderson & Moss 1985). La composition cellulaire des vaisseaux sanguins est différente chez l'homme et chez la souris, les artérioles dans les îlots humains comprenant toujours des cellules musculaires lisses, tandis que chez la souris, cette configuration est rare, les artérioles

étant majoritairement composées de cellules endothéliales uniquement, suggérant que les mécanismes de vasoconstriction/vasodilatation jouent un rôle plus important dans la régulation des îlots chez l'Homme (Rodriguez-Diaz *et al.* 2011a). Cette vascularisation est essentielle pour l'homéostasie du glucose, non seulement car elle assure un approvisionnement en oxygène suffisant pour pallier aux besoins élevés des cellules β , ainsi qu'un relargage efficace des hormones sécrétées dans la circulation, mais elle permet également de réguler par voie hormonale (incrétines, hormones de stress...) le fonctionnement des îlots et donc la libération des différentes hormones pancréatiques impliquée dans le contrôle de la glycémie (In't Veld & Marichal 2010).

2.3.3. Innervation

Parmi les multiples mécanismes régulant la libération hormonale des îlots, le cerveau, en tant qu'organe de contrôle central, intervient également en recrutant le système nerveux autonome. Cependant, les îlots ne sont pas pour autant entièrement contrôlés par le système nerveux autonome : ils sont considérés comme indépendants étant donné qu'ils sont équipés de la machinerie cellulaire nécessaire pour détecter les variations de la glycémie et y répondre de façon adéquate. Le système nerveux autonome exerce plutôt sur les îlots un contrôle adaptatif, permettant d'ajuster leur réponse aux situations aiguës de prise alimentaire ou de stress (Rodriguez-Diaz & Caicedo 2014).

La présence de fibres nerveuses non myélinisées fut observée en premier lieu par Paul Langerhans lui-même dans les pancréas de chat et de lapin lorsqu'il décrit les îlots en 1869. Il nota que ces fibres étaient connectées aux ganglions nerveux pancréatiques et formaient un réseau nerveux dense jointif aux îlots. Ces observations furent par la suite confirmées au début des années 1900 par de nombreuses études de microscopie optique dans les îlots de plusieurs espèces, dont l'Homme (Ahrén 2000). La plupart des études ayant été conduites sur une espèce en particulier, et les méthodes variant entre les différentes études, il est difficile d'établir une comparaison de l'innervation insulaire entre les différentes espèces. Cependant, étant donné les différences inter-espèces existant dans l'anatomie des îlots, il est normal que leur innervation varie également (Rodriguez-Diaz & Caicedo 2014).

De récentes études ont apporté de nouvelles données sur les patrons d'innervation au sein des îlots chez la souris et chez l'Homme. Ainsi, Rodriguez-Diaz *et al.* (2011a) ont montré

que chez la souris, les îlots sont densément innervés et les fibres nerveuses autonomes pénètrent très clairement le parenchyme endocrine des îlots pour aller connecter les cellules endocrines. Les axones parasympathiques connectent à la fois les cellules α et β , et les fibres sympathiques innervent plutôt les cellules α (*Figure 6*). En revanche, dans les îlots humains, il y a peu voire aucune innervation directe sur les cellules endocrines : les fibres sympathiques longent les vaisseaux sanguins et y contactent les cellules musculaires lisses. Les axones parasympathiques cholinergiques sont quant à eux très rares dans les îlots humains. Les auteurs en ont conclu que la régulation des îlots par le système nerveux autonome se fait donc probablement par des mécanismes différents chez la souris et chez l'Homme (Rodriguez-Diaz *et al.* 2011a, Rodriguez-Diaz & Caicedo 2014).

Cependant, une autre étude, utilisant la microscopie tridimensionnelle pour étudier l'innervation des îlots dans les préparations pancréatiques de souris rendues transparentes à l'aide de solutions spéciales, a remis en cause les précédentes observations de Rodriguez-Diaz *et al.* (2011a) en montrant que les fibres sympathiques dans les îlots de souris contactaient aussi bien les cellules α périphériques que les artérioles à l'intérieur de l'îlot, suggérant une action directe sur la sécrétion de glucagon tandis que les neurotransmetteurs seraient acheminés dans le cœur de cellules β des îlots par les vaisseaux sanguins innervés (Ahrén 2012, Chiu *et al.* 2012). Cela remet également en cause les différences inter-espèce avancées par l'étude de Rodriguez-Diaz *et al.* (2011a), qui restent donc à définir précisément en utilisant la même technique de microscopie confocale tridimensionnelle.

Malgré ces divergences de résultats concernant les études anatomiques, les études fonctionnelles s'accordent sur les rôles de chacune des branches du système nerveux autonome dans la régulation des îlots. L'activation du système parasympathique stimule la sécrétion d'insuline et de glucagon, mais également de la somatostatine et du polypeptide pancréatique (la sécrétion de ce dernier étant souvent utilisée comme marqueur de l'activation parasympathique des îlots). Le système parasympathique joue un rôle durant la phase céphalique de la sécrétion d'insuline, qui a été déjà abordée au cours du chapitre 1. Le système parasympathique agit également comme un synchronisateur de l'activité des îlots au sein du pancréas, afin d'assurer une sécrétion d'insuline pulsatile dans la circulation portale. Ce mécanisme est assuré par les ganglions intrapancréatiques qui ont une activité oscillatoire.

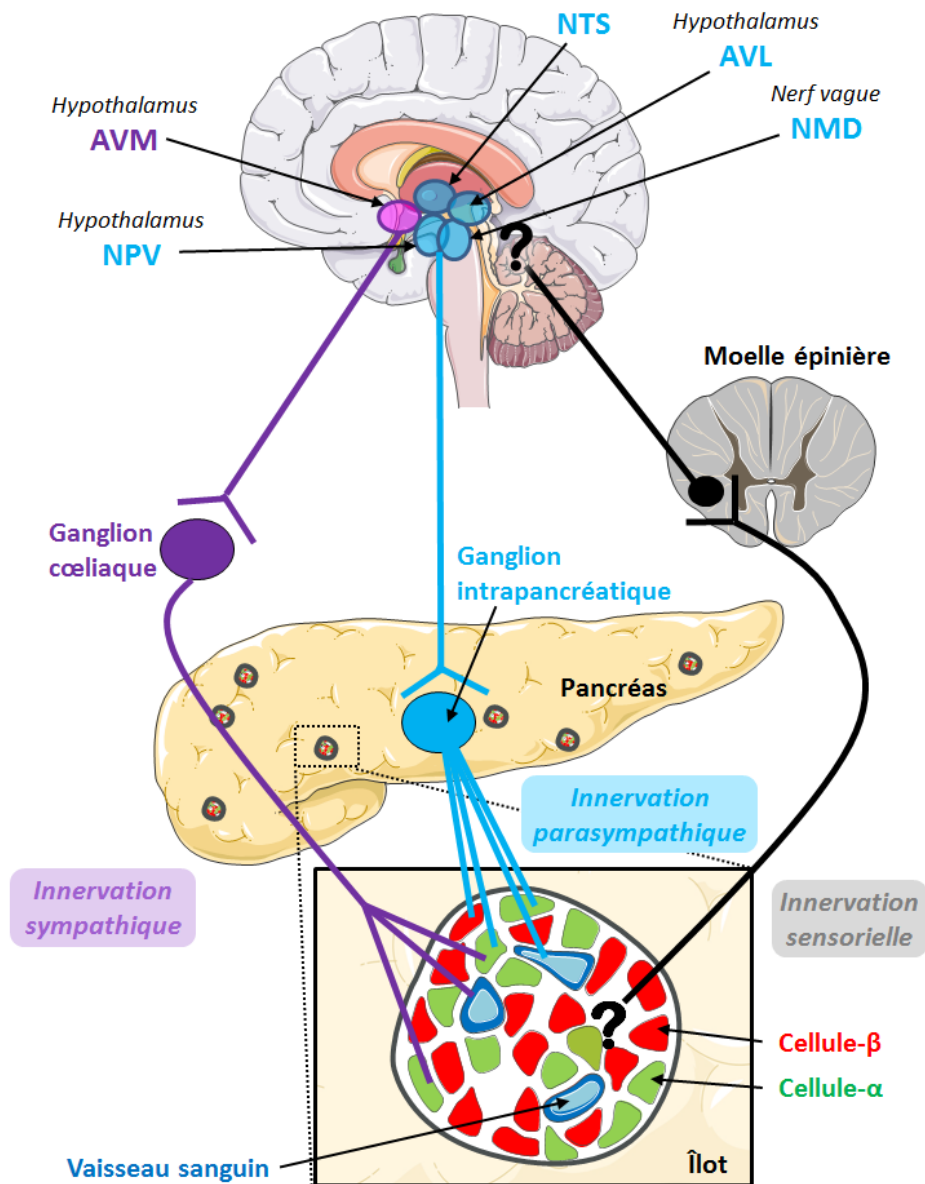


Figure 6 : Schéma de l'innervation de l'îlot par le système nerveux autonome.

Les nerfs sympathiques (en violet) partant du cerveau innervent le ganglion coeliaque (ou paravertébral); les nerfs sympathiques post-ganglionnaires vont ensuite connecter les îlots et y innervent les cellules α mais pas les cellules β . Les nerfs parasympathiques (en bleu) passent du cerveau jusqu'aux ganglions intrapancréatiques par le nerf vague principalement; les nerfs parasympathiques postganglionnaires passent ensuite dans les îlots, où ils innervent les vaisseaux sanguins et les cellules α et β . Enfin les nerfs sensoriels (en noir) partent des îlots, passent par la racine dorsale de la moelle épinière pour connecter les neurones post-ganglionnaires qui rejoignent le système nerveux central; certains nerfs sensoriels passent également par le nerf vague, ce qui n'est pas illustré sur ce schéma. Plusieurs centres cérébraux contrôlent les nerfs autonomes dans un schéma complexe : l'aire ventro-médiane (AVM) de l'hypothalamus est importante pour le système sympathique, tandis que l'aire ventro-latérale (AVL) et le noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus, le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau moteur dorsal (NMD) du nerf vague sont importants pour les nerfs parasympathiques. Les connections des nerfs sensoriels aussi bien au niveau central qu'au niveau insulaire restent à définir. *D'après Ahrén (2012).*

L'activation du système sympathique a au contraire un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline, et serait quant à elle impliquée dans l'adaptation de la réponse des îlots dans les situations de stress, que ce soit des stress métaboliques (hypoglycémie, neuroglucopénie) afin de ré-augmenter la glycémie, durant l'exercice et les situations de danger (réponse « fight-or-flight ») pour assurer le meilleur apport possible en glucose aux muscles alors sollicités, ou encore en cas d'hypovolémie, pour compenser la perte de liquide sanguin en augmentant sa pression osmotique par une hausse de sa concentration en glucose. Les îlots reçoivent également des afférences de nerfs sensoriels dont le rôle est loin d'être compris, mais qui réguleraient la libération des hormones pancréatiques et ainsi l'homéostasie glucidique (Ahrén 2000, Rodriguez-Diaz & Caicedo 2014).

Les afférences de chaque branche du système nerveux autonome agissent sur les îlots en relargant des neurotransmetteurs et des neuropeptides spécifiques à proximité des cellules endocrines. Ainsi, l'action du système nerveux parasympathique est médiée par son neurotransmetteur principal qui est l'acétylcholine (ACh), ainsi que par le vasoactive intestinal polypeptide (VIP), le gastrin releasing peptide (GRP), le pituitary adelylate cyclase activating polypeptide (PACAP) et le cocaïn- amphetamine-regulated transcript (CART). Les effets de l'activation du système sympathique passent quant à eux par le relargage de noradrénaline (NA), de neuropeptide Y (NPY) et de galanine. Enfin, les neuropeptides sensoriels sont le calcitonin gene-related peptide (CGRP) et la substance P (Ahrén 2000, Ahrén 2006). Les îlots sont donc équipés de récepteurs spécifiques afin d'intégrer les informations transmises par le système nerveux. Cependant, certains de ces neurotransmetteurs et neuropeptides sont également produits par les cellules endocrines et utilisés comme des vecteurs de signalisation auto-crine ou paracrine au sein de l'îlot, et peuvent donc interférer avec le mode nerveux de régulation, comme c'est le cas notamment de l'acétylcholine qui est sécrétée par les cellules α et agit sur les cellules β dans les îlots humains (Rodriguez-Diaz *et al.* 2011b) (*cf.* chapitre 5).

3. LA CELLULE β INSULINOSÉCRÉTRICE

3.1. *Un détecteur du glucose essentiel au maintien de la glycémie*

Les cellules β synthétisent, stockent et libèrent l'insuline, qui est la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme. La cellule β intègre l'ensemble des signaux métaboliques, hormonaux et nerveux de l'organisme et ajuste en permanence sa sécrétion d'insuline en fonction ces signaux.

La perte de la fonction β pancréatique conduit au développement de désordres métaboliques, tels que les diabètes sucrés. Dans le diabète de type 1, l'hyperglycémie résulte clairement de l'insulinopénie causée par la destruction immunologique des cellules β . Dans le diabète de type 2, deux altérations sont observées : l'insulinorésistance des tissus périphériques et le déficit de la fonction des cellules β , qui semblent évoluer en parallèle au cours de la progression de la maladie, sans qu'il n'ait été déterminé lequel de ces deux phénomènes apparaît en premier (Lyssenko *et al.* 2005). Il n'est pas clairement établi si la réduction de la sécrétion d'insuline observée dans le DT2 résulte d'une diminution de la quantité de cellules β ou d'un dysfonctionnement de celles-ci. Butler *et al.* (2003) ont montré une forte réduction de la masse des cellules β chez les patients atteints de DT2, mais ces résultats n'ont pas été reproduits (Rahier *et al.* 2008). Ainsi, même si une modeste destruction des cellules β peut se manifester dans le DT2, celle-ci n'est très certainement pas le seul ni même le principal facteur dans l'étiologie du DT2, le dysfonctionnement des cellules β étant probablement plus impliqué (Ashcroft & Rorsman 2004). D'autre part, des études d'associations pangénomiques (ou Genome-wide association study – GWAS), qui visent à déterminer la fréquence d'expression de multiples variants génétiques (souvent des polymorphismes nucléotidiques, ou single-nucleotide polymorphism – SNP) chez de nombreux individus afin d'étudier leurs corrélations avec des traits phénotypiques particuliers, ont identifié de nombreux SNP associés au DT2, parmi lesquels beaucoup semblent être impliqués dans la fonction des cellules β , leur développement ou encore la régulation la masse β -pancréatique (Groop & Lyssenko 2009, Ahlqvist *et al.* 2011). De même, de nombreuses formes monogéniques de diabète sont direc-

tement liées à des mutations de gènes impliqués dans la machinerie de détection du glucose ou de son métabolisme dans la cellule β (Ashcroft & Rorsman 2012).

La cellule β est donc essentielle dans le maintien de l'homéostasie glucidique, en raison de sa fonction de sécrétion de l'insuline, mais également par son rôle de détecteur de glucose permettant le déclenchement de la sécrétion d'insuline, et d'intégrateur des autres signaux métaboliques et nerveux qu'elle reçoit et qui modulent sa fonction. Dans la suite de ce chapitre, nous aborderons rapidement le processus et les différentes étapes de la biosynthèse de l'insuline, puis verrons de quelle manière la cellule β couple la détection du glucose extracellulaire à l'exocytose de l'hormone hypoglycémiante.

3.2. L'insuline

3.2.1. Fonctions

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'insuline a pour fonction de diminuer les taux de glucose circulant afin de les maintenir ou les ramener dans la gamme normoglycémique. Elle a pour cela différents effets sur de multiples fonctions métaboliques de l'organisme. Ces effets peuvent être directs ou indirects. Globalement, l'insuline favorise d'une part la captation du glucose par les organes cibles, en augmentant l'expression des transporteurs au glucose GLUT à la membrane des cellules (Bogan 2012), leur permettant de directement utiliser le métabolite, ou le stocker sous forme de glycogène, grâce à une activation de la glycolyse et de la glycogène synthase par l'insuline. Elle stimule également le stockage des lipides dans les adipocytes et contribue à la rétention protéique dans tous les tissus. D'autre part, l'insuline inhibe la production de glucose endogène au niveau des hépatocytes et des cellules musculaires principalement. Ces deux actions combinées contribuent à diminuer la glycémie (Cheatham & Kahn 1995). L'insuline régule également les fonctions centrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et la régulation métabolique, en agissant sur ses récepteurs présents notamment dans l'hypothalamus (Schwartz *et al.* 1992, Obici & Martins 2010) (*cf.* chapitre 1 pour une description plus détaillée concernant les effets de l'insuline sur ses cibles principales).

3.2.2. Structure

L'insuline fut la première protéine à voir sa structure déterminée en 1955 par le groupe de Frederick Sanger, travaux grâce auxquels il obtint en 1958 le premier de ses deux prix Nobel. L'insuline est une hormone qui comptabilise 51 acides aminés pour un poids moléculaire de 6 kDa. Elle est constituée de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne A qui comporte 21 acides aminés, et la chaîne B composée de 30 acides aminés. Ces deux chaînes sont reliées entre elles par deux ponts disulfures. Un pont disulfure intracaténaire relie les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A (Sanger 1959). La structure de l'insuline est presque identique dans toutes les espèces mammifères (*Figure 7.A*). À pH neutre, dans la gamme des concentrations physiologiques, l'insuline se présente sous sa forme active qui est la forme monomérique.

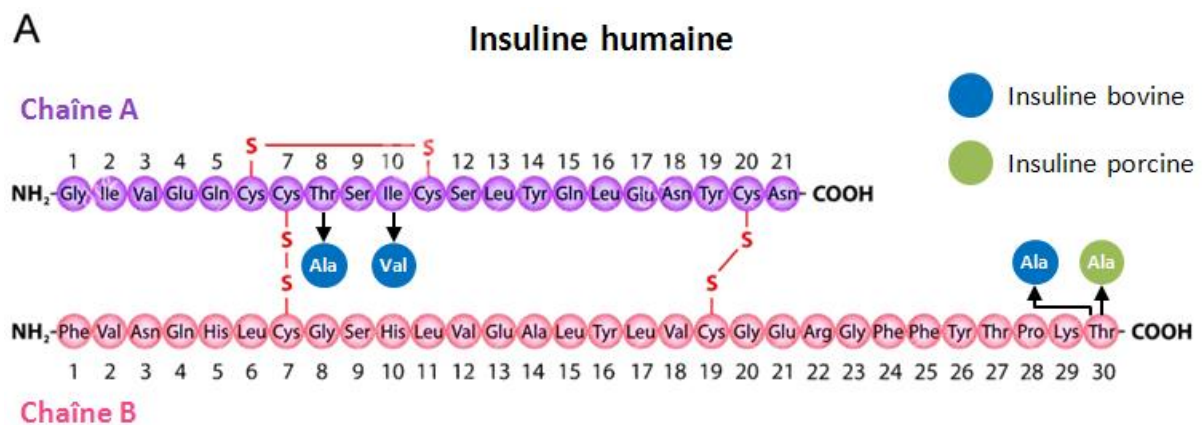


Figure 7 : Structure de l'insuline

A: Structure primaire de l'insuline humaine. L'insuline porcine diffère de l'insuline humaine par 1 acide aminé (en vert), et l'insuline bovine par 3 acides aminés (en bleu).

<http://thumbs.dreamstime.com/z/structure-human-insulin-27081204.jpg> modifié d'après Magnan et Ktorza (2005).

B: Structure tertiaire tridimensionnelle de l'insuline porcine: la chaîne A est représentée en blanc et la chaîne B en rouge. Le volume occupé par les acides aminés figure en transparence.

<http://visualscience.ru/en/projects/insulin/3d-model/>

Cette forme active de l'insuline circule à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans le sang. Ce monomère présente une structure globulaire (*Figure 7.B*) dont le noyau central est hydrophobe. À pH neutre ou acide et pour des concentrations supraphysiologiques,

l'insuline peut spontanément se dimériser. L'association de trois dimères d'insuline pour former un hexamère requiert la présence de deux atomes de zinc. Ces cristaux hexamériques d'insuline constituent la forme de stockage majeure de l'hormone dans les vésicules de sécrétion (Magnan & Ktorza 2005, Steiner 2008). Cette forme cristalline de l'insuline, qui est la forme la plus dense de l'hormone *in vivo*, permet ainsi de stocker de grandes quantités de la protéine dans les petits espaces que sont les vésicules sécrétoires. La structure présentée en *Figure 7* est celle du produit terminal de la biosynthèse de l'hormone. Cependant, comme c'est le cas pour toutes les protéines, avant d'aboutir au peptide mature, le précurseur de l'insuline subit plusieurs modifications post-traductionnelles que nous allons maintenant aborder.

3.2.3. Synthèse et maturation

La structure du gène de l'insuline a été remarquablement conservée au cours de l'évolution. Chez les mammifères, il n'existe qu'un seul exemplaire de ce gène, exception faite du rat et de la souris, chez lesquels se retrouvent deux exemplaires non alléliques (Magnan & Ktorza 2005), la raison d'être de cette duplication génétique demeurant inconnue.

L'insuline est produite uniquement par la cellule β . La biosynthèse de l'insuline se fait en plusieurs étapes successives de maturation (*Figure 8.A*) : la traduction de l'ARNm issu de la transcription du gène de l'insuline se fait au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et aboutit à la formation de la pré-proinsuline. Ce précurseur comprend à son extrémité C-terminale la chaîne A de la future molécule d'insuline qui est reliée, par l'intermédiaire d'un peptide connecteur de 30–35 acides aminés appelé peptide C, à la chaîne B. Celle dernière est dotée d'un peptide signal hydrophobe de 24 acides aminés à son extrémité N-terminale, qui permet l'adressage du précurseur de l'insuline dans la lumière du RER. Le peptide signal est ensuite clivé du reste du précurseur pour former la proinsuline, qui se replie et acquiert sa structure native avec la formation des trois ponts disulfures. La proinsuline est alors transportée dans l'appareil de Golgi où commence la conversion du pro-peptide en insuline, qui se termine dans des vésicules de sécrétion immatures tapissées de clathrine sous l'action de deux endopeptidases (les prohormone-convertases 2 et 3) et de la carboxypeptidase H, activée par une acidification du milieu intravésiculaire qui survient au cours du processus de maturation de l'insuline (Orci *et al.* 1987). Ces enzymes opèrent alors le clivage de la proinsuline pour donner l'insuline bicaténaire et le peptide C de 31 résidus aminés. Simul-

tanément, la vésicule perd son revêtement de clathrine. L'acidification du milieu vésiculaire, la présence de la forme finale de l'insuline ainsi que la perte de ce manteau de clathrine caractérisent les vésicules matures. L'insuline s'hexamérise avec le zinc pour former les cristaux d'insuline. C'est de ces cristaux, denses aux électrons lorsqu'ils sont observés en microscopie électronique, que les granules sécrétoires contenant l'insuline doivent leur nom de « vésicules larges à cœur dense ».

L'insuline et le peptide C sont libérés en quantité équimolaire lors de l'exocytose de ces vésicules (*Figure 8.B*). Cette dernière étape d'exocytose étant obligatoirement déclenchée par un stimulus, ce mode de sécrétion est nommé « sécrétion régulée ». Dans les conditions physiologiques, il s'agit du mode de sécrétion majoritaire, comptant pour plus de 95% de la libération de l'hormone. Un autre mode de sécrétion, la « sécrétion constitutive », existe également, mais est minoritaire dans la cellule β (Magnan & Ktorza 2005, Steiner 2008).

D'autres facteurs, contenus dans les vésicules larges à cœur dense, sont également relargués lors de l'exocytose de l'insuline, comme par exemple le zinc, l'ATP, des peptides tels que l'amyline (encore appelée islet amyloid polypeptide, IAPP) ou les chromogranines A et B, ainsi que des neuropeptides et neurotransmetteurs comme par exemple l'acide γ -aminobutyrique (GABA), la sérotonine (également nommée 5-hydroxytryptamine, 5-HT), le NPY ou encore le PACAP. Si certains de ces facteurs jouent un rôle dans la maturation et le stockage de l'insuline (comme le zinc et les chromogranines) tandis que le rôle physiologiques de certains autres est inconnu (comme cela est le cas pour l'IAPP), la plupart jouent un rôle régulateur dans la fonction des îlots par des actions autocrines et/ou paracrines (Braun *et al.* 2012), ce qui sera l'objet d'un chapitre ultérieur.

En raison de sa fonction sécrétoire, la capacité de stockage de l'insuline de la cellule β est particulièrement élevée afin de pouvoir libérer suffisamment d'insuline en réponse à une augmentation de la glycémie. Les vésicules matures contenant l'insuline peuvent ainsi demeurer plusieurs jours dans le cytosol avant de subir l'exocytose. Par conséquent, les mécanismes de contrôle de la biosynthèse et ceux régulant la sécrétion de l'insuline sont forcément distincts. Ainsi, toute molécule influençant la sécrétion d'insuline intervient en modulant les mécanismes impliqués dans l'exocytose régulée ou son déclenchement, et hormis certains substrats énergétiques comme le glucose ou le GLP-1, les stimuli de la sécrétion de l'insuline n'ont pas d'influence majeure sur la biosynthèse de l'hormone (Magnan & Ktorza 2005).

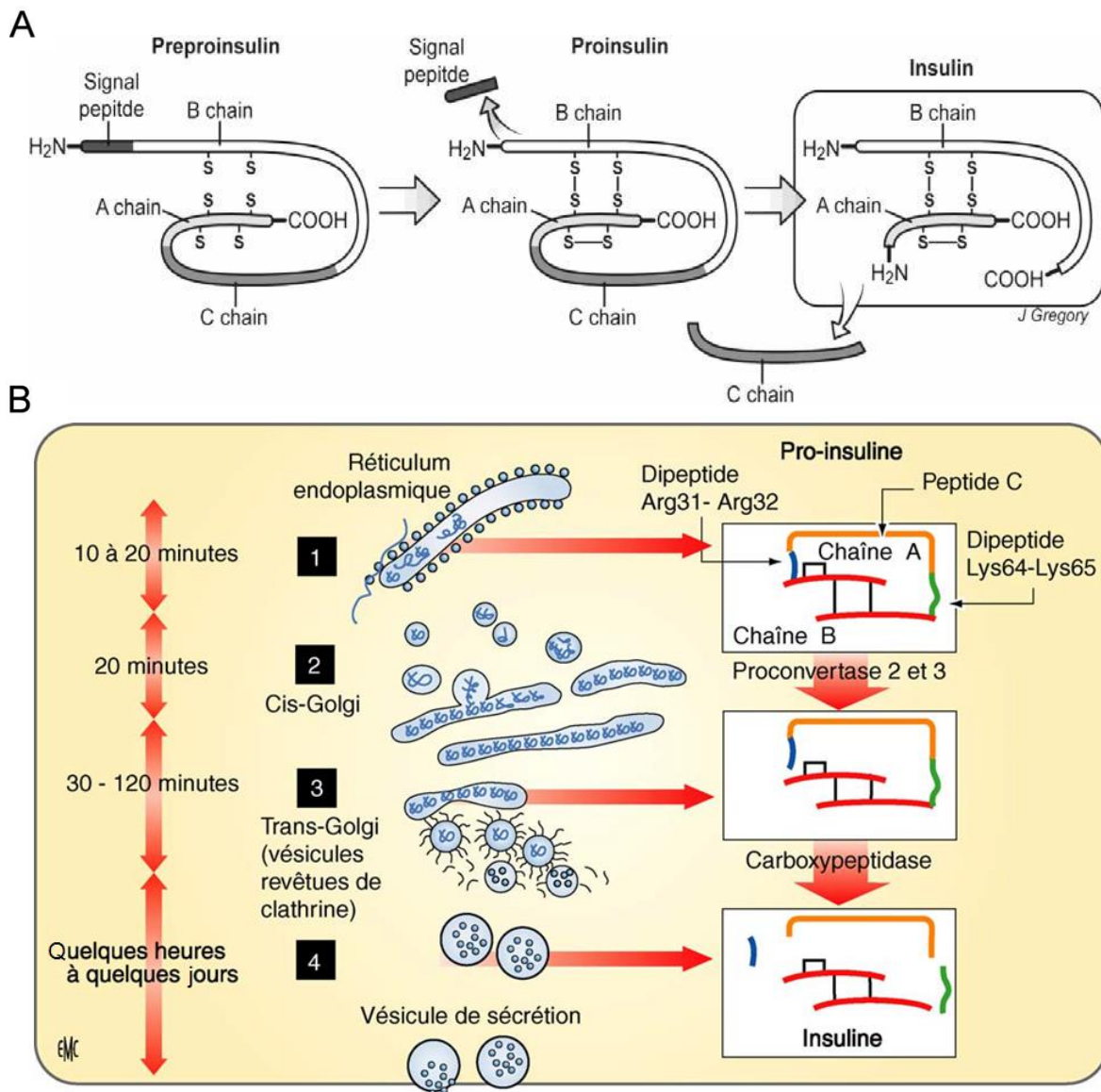


Figure 8 : Synthèse et maturation de l'insuline dans la cellule- β

A: Les différents précurseurs successifs de l'insuline. D'après Brass et al. (2010). **B:** Biosynthèse et sécrétion régulée de l'insuline: **1.** Début de la traduction : formation de pré-proinsuline puis de proinsuline (clivage du peptide signal) dans la lumière du réticulum endoplasmique. **2.** La proinsuline est transportée dans des vésicules intermédiaires vers le cis-Golgi. **3.** La conversion complète a lieu dans le Golgi et les vésicules issues du trans-Golgi. **4.** La proinsuline est clivée pour donner le peptide C et l'insuline. Les molécules d'insuline sont stockées sous forme cristalline dans les vésicules de sécrétion matures. D'après Magnan et Ktorza (2005).

3.3. Détection des besoins en insuline par la cellule β

3.3.1. Couplage stimulus-sécrétion

Les granules matures contenant l'insuline libèrent leur contenu lorsque la glycémie augmente. Ce mécanisme nécessite tout un enchaînement d'événements au sein de la cellule, qui couplent la détection du glucose à la sécrétion d'insuline, et que l'on peut séparer en deux phases successives (Figure 9). La première phase est dite phase proximale, et correspond à l'entrée du glucose dans la cellule β et à son métabolisme cytosolique et mitochondrial. La production de facteurs de couplage mitochondriaux au cours de cette première phase permet l'amorçage de la seconde phase, dite distale, consistant en la sécrétion d'insuline proprement dite, c'est-à-dire le déclenchement de l'exocytose des vésicules d'insuline (Lang 1999, MacDonald *et al.* 2005b).

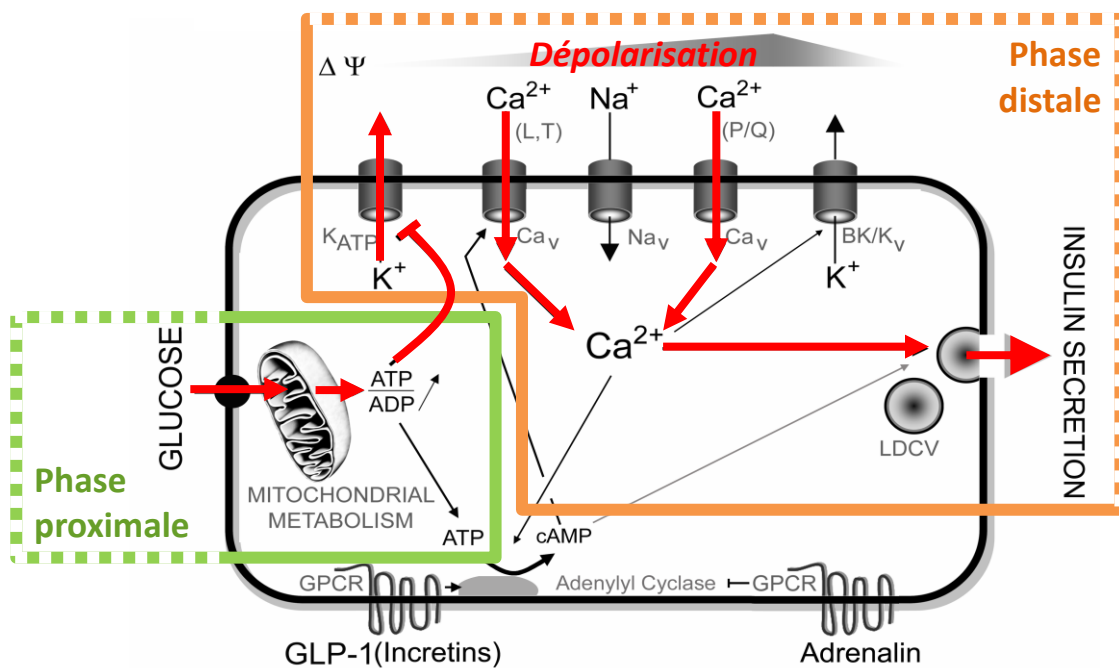


Figure 9 : Phases proximale et distale du couplage stimulus sécrétion dans la cellule β

Les événements proximaux (encadrés en vert), incluant l'entrée du glucose et son métabolisme cytosolique (glycolyse) puis mitochondrial aboutissent à la production de signaux mitochondriaux tels que l'ATP. Ces signaux régulent la sécrétion d'insuline en contrôlant les effecteurs distaux (encadrés en orange) qui incluent l'excitabilité membranaire, l'influx calcique et enfin le recrutement et l'exocytose des granules d'insuline. Des mécanismes d'amplification métaboliques et neurohormonaux régulent les étapes distales afin de moduler la sécrétion d'insuline. *Schéma de Raoux et al. (2011) adapté d'après MacDonald et al. (2005b).*

○ Phase proximale : entrée et métabolisme du glucose dans le cytosol

Afin d'adapter sa sécrétion d'insuline à la glycémie ambiante, la cellule β doit être capable de déterminer avec précision et à tout instant quelle est la concentration extracellulaire de glucose. La cellule β , qui à l'instar de toutes les autres cellules de l'organisme doit métaboliser le glucose pour ses propres besoins en énergie, utilise ce processus métabolique dans le mécanisme de détection du glucose, et pour cela, le glucose doit pénétrer à l'intérieur de la cellule. Le glucose étant polaire, il ne diffuse pas au travers des membranes lipidiques, et entre donc dans la cellule par des transporteurs du glucose pour y être ensuite métabolisé. La cellule β exprime un transporteur de glucose à faible affinité et haute capacité, GLUT2 chez les rongeurs, ce qui lui permet d'établir un équilibre de la concentration du glucose entre l'intérieur et l'extérieur de sa membrane plasmique étant donné que, même pour de fortes concentrations du métabolite, ce transporteur ne sature pas : l'entrée du glucose dans la cellule peut donc se faire sans restriction, et sa concentration dans le cytosol reflète à tout moment les valeurs de la glycémie (Thorens *et al.* 1988, Newgard & McGarry 1995, Thorens 2008). Ce transporteur est ainsi également retrouvé dans les autres détecteurs du glucose de l'organisme, de même que dans les hépatocytes qui doivent capter du glucose non seulement pour leurs propres besoins énergétiques, mais également pour constituer des réserves de glycogène. Les cellules β humaines, à la différence des cellules β de souris, expriment les transporteurs GLUT1 et GLUT3 plutôt que GLUT2 (De Vos *et al.* 1995, McCulloch *et al.* 2011, Rorsman & Braun 2013).

Suite à son entrée dans le cytosol de la cellule β , le glucose y est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (GK, également nommée hexokinase IV), qui est une hexokinase à faible affinité pour le glucose et qui en conséquence ne sature pas lorsque les taux de glucose intracellulaires augmentent. De plus, contrairement aux hexokinases I, II, et III retrouvées dans les autres cellules de l'organisme, la GK ne subit pas de rétrocontrôle négatif par le G6P. Ainsi, les taux de G6P produits par la GK correspondent exactement aux taux extracellulaires de glucose, et certains auteurs considèrent donc cette enzyme comme le véritable détecteur du glucose dans la cellule β (Newgard & McGarry 1995, Matschinsky *et al.* 1998, Thorens 2008). Certaines formes de diabètes monogéniques sont d'ailleurs provoquées par une mutation sur le gène de la GK (Porter & Barrett 2005). Le G6P résultant de l'action de la GK emprunte ensuite la voie de la glycolyse, toujours dans le cytosol, pour être métabolisé en pyruvate, NADH et ATP (Schuit *et al.* 1997). Le pyruvate et le NADH entrent

ensuite dans la mitochondrie où ils interviennent dans la production d'ATP.

Le pyruvate est préférentiellement dirigé vers la mitochondrie pour être métabolisé via le cycle des acides tricarboxyliques (ou cycle de Krebs), car la cellule β n'exprime que de très faibles taux de lactate déshydrogénase (Ishihara *et al.* 1999). Le pyruvate n'est donc pas métabolisé en lactate, ce qui prévient sa diffusion loin des voies métaboliques mitochondriales (Zhao *et al.* 2001), ainsi que son utilisation dans la néoglucogenèse. Grâce à cela, 90% du glucose est oxydé dans les cellules β contre 10 à 15% seulement dans les autres types cellulaires dont les taux d'expression de la lactate déshydrogénase sont plus élevés (Schuit *et al.* 1997). Cela permet encore une fois de conserver une corrélation entre les taux extracellulaires de glucose et les produits issus du métabolisme qui agissent ensuite comme facteurs de couplage. Le NADH cytosolique, produit au cours de la glycolyse grâce à l'action de la glycéraldhéride-3-phosphate déshydrogénase, entre dans la mitochondrie par les systèmes de navette glycérol-phosphate et malate-aspartate. L'inhibition de ces systèmes de navette entraîne une perte de la sécrétion d'insuline, désignant le NADH comme un acteur important dans le couplage entre la phase proximale et la phase distale de la sécrétion d'insuline (Eto *et al.* 1999).

Le métabolisme mitochondrial du pyruvate et du NADH génère de multiples facteurs (Figure 10). Certains de ces facteurs ont été identifiés comme étant impliqués dans le couplage stimulus-sécrétion (MacDonald *et al.* 2005a).

- Facteurs de couplage mitochondriaux

- **La production d'ATP :** Une fois entrés dans la mitochondrie, le pyruvate et le NADH servent de substrat à la production d'ATP, ce qui a pour conséquence une variation du ratio ATP/ADP cytosolique, qui est le facteur de couplage mitochondrial le mieux caractérisé. Comme nous le verrons par la suite, une augmentation du ratio ATP/ADP dans le cytosol joue un rôle primordial dans le déclenchement de la phase distale de la sécrétion d'insuline. Le métabolisme du pyruvate au cours du cycle de Krebs produit de l'ATP et du NADH dans la mitochondrie. Ce NADH mitochondrial s'ajoute au NADH cytosolique issu de la glycolyse, et stimule la chaîne respiratoire ce qui aboutit *in fine* à la synthèse d'ATP par l'ATP-synthase. L'activation de la chaîne respiratoire provoque également une stimulation des transporteurs calciques voltage-dépendants, ce qui augmente l'activité de la déshydrogénase calcium-dépendante et ainsi la production de NADH et d'ATP à partir du cycle de Krebs, de même

que le transport de l'ATP dans le cytosol, tout cela contribuant à l'augmentation de la concentration d'ATP cytosolique et du ratio ATP/ADP (MacDonald *et al.* 2005b). Ce métabolisme du NADH, avec le catabolisme du pyruvate dans le cycle de Krebs, constitue la production mitochondriale d'ATP, qui représente plus de 98% de la production totale d'ATP dans la cellule β (Erecinska & Silver 1992). Toutefois, la part de participation des systèmes de production mitochondriaux et cytosolique de l'ATP dans la variation du ratio ATP/ADP reste controversée. Il a en effet été montré qu'un bloqueur du cycle de Krebs n'abolit pas la sécrétion

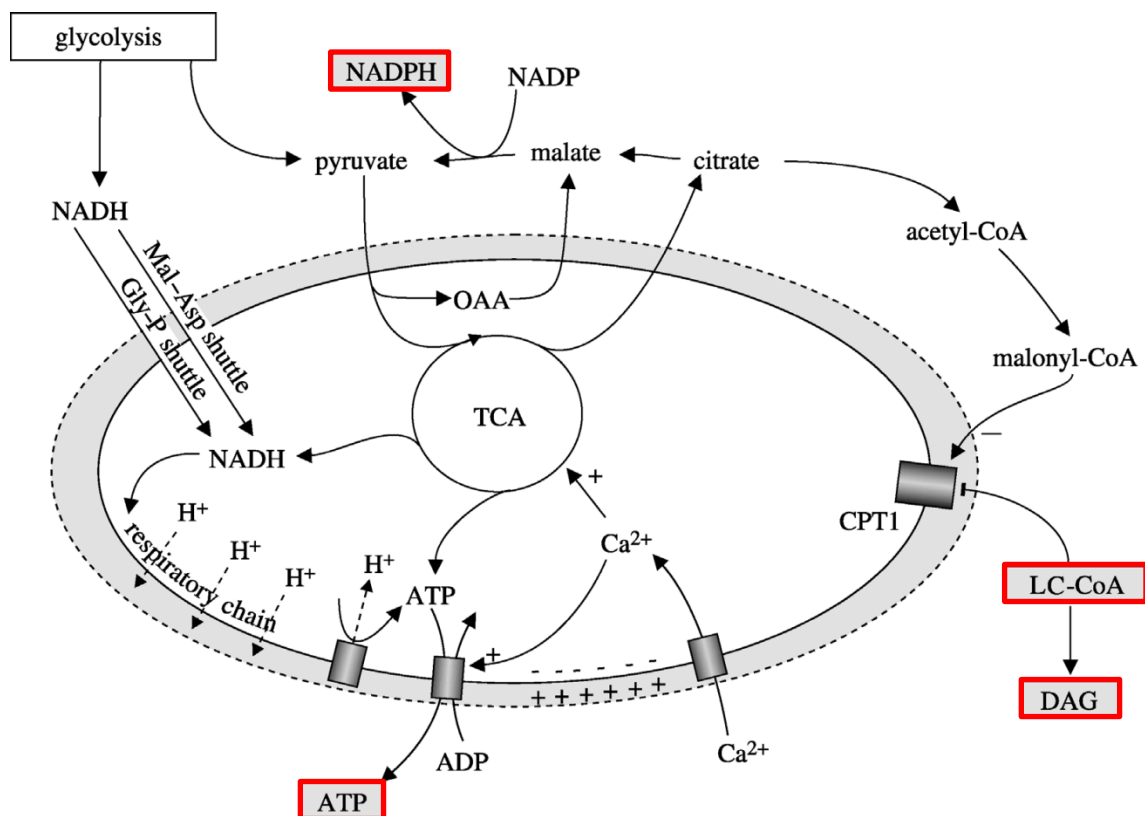


Figure 10 : Quelques facteurs mitochondriaux et leur production

Le NADH mitochondrial produit à partir du pyruvate au cours du cycle de Krebs (Tricarboxylic acid cycle: TCA) et le NADH transporté depuis le cytosol par les navettes malate-aspartate (Mal-Asp) et glycérol-phosphate (Gly-P) activent la chaîne respiratoire, ce qui engendre un gradient d'ions H^+ ainsi que l'hyperpolarisation de la matrice mitochondriale. La dissipation du gradient H^+ déclenche la production d'ATP par l'ATP-synthase, tandis que l'hyperpolarisation de la matrice promeut l'entrée d'ions Ca^{2+} qui stimule d'avantage de cycle de Krebs et le transport d'ATP hors de la mitochondrie. Le transport du malate et du citrate (de même que de l'isocitrate non représenté ici), et leur conversion consécutive en pyruvate dans le cytosol génère une augmentation du NADPH cytoplasmique. De même, le citrate exporté peut être converti en acétyl-CoA puis en malonyl-CoA, qui bloque alors la cartinine palmitoyltransferase 1 (CPT1) qui est le transporteur des LC-CoA. Cela induit une augmentation de la concentration des LC-CoA dans le cytosol ainsi qu'en messagers secondaires potentiels dérivés des lipides tels que le diacylglycérol (DAG). Les signaux les plus importants sont indiqués en rouge. D'après MacDonald *et al.* (2005b).

d'insuline, contrairement à un bloqueur de la glycolyse, ce qui suggère que la voie cytosolique pourrait jouer un rôle plus important dans la régulation du ratio ATP/ADP (Mertz *et al.* 1996). Néanmoins, l'hypothèse d'un rôle important de la production mitochondriale d'ATP est supportée par le fait qu'une stimulation avec de l'acide α -kétoisocaproïque, dont le catabolisme est entièrement pris en charge par le cycle de Krebs, est capable de fermer les canaux K_{ATP} et d'induire la sécrétion d'insuline (Best 1997). Cependant, cet effet résulte probablement d'une action directe de l'acide α -kétoisocaproïque sur les canaux K_{ATP} (Branstrom *et al.* 1998). Ainsi, le ratio ATP/ADP ne semble pas être l'unique paramètre physiologique servant de facteur de couplage, et d'autres facteurs mitochondriaux pourraient entrer en jeu (MacDonald *et al.* 2005a).

▪ **Les acyl-CoA à chaîne longue (LC-CoA)** sont des espèces très réactives issues du métabolisme des acides gras, mais qui sont également produites lors du catabolisme du glucose. Ils ont été proposés comme facteurs de couplage alternatifs (Prentki & Corkey 1996). Selon ce modèle (Deeney *et al.* 2000), le pyruvate est, au cours du cycle de Krebs, partiellement métabolisé en citrate qui, une fois transporté hors de la mitochondrie est converti en malonyl-Coenzyme A dans le cytosol. Le malonyl-CoA inhibe alors la carnitine palmoyltransférase 1 (CPT1) qui est une enzyme clé de la régulation des acides gras. L'inhibition de CPT1 provoque une augmentation des LC-CoA cytosoliques, ce qui potentialise la sécrétion d'insuline par acétylation des protéines de régulation. Les LC-CoA peuvent également être convertis en d'autres métabolites bioactifs, tels que le diacylglycérol (DAG), responsable de l'activation de ses effecteurs connus, tels que la protéine kinase C (PKC) qui interagit ensuite avec des composants de la machinerie d'exocytose. Plusieurs études corrélatives supportent cette hypothèse (Corkey *et al.* 1989, Chen *et al.* 1994), cependant, le fait qu'aucune altération de la sécrétion d'insuline n'ait été observée lors de la perturbation directe du couplage entre les voies métaboliques du glucose et des lipides porte à controverse (Mulder *et al.* 2001). Toutefois, les LC-CoA jouent un rôle important dans le transport vésiculaire entre les différents compartiments de l'appareil de Golgi (Pfanner *et al.* 1989), et plusieurs études ont montré une amplification de la sécrétion d'insuline induite par le glucose lors d'une administration aiguë d'acides gras, supposément via l'augmentation de LC-CoA dans les cellules β (Stein *et al.* 1997). Ces résultats doivent néanmoins être nuancés étant donné l'effet potentialisateur sur la sécrétion d'insuline exercé par les acides gras libres agissant sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Nolan *et al.* 2006). L'hypothèse selon laquelle les LC-CoA

jouent un rôle amplificateur de la sécrétion d'insuline n'est cependant pas à déclinier, bien que les mécanismes impliqués ne soient pas totalement éclaircis, les LC-CoA pouvant intervenir soit par une action directe favorisant la fusion membranaire (Pfanner *et al.* 1990), soit par l'intermédiaire des facteurs métaboliques (DAG) issus du métabolisme du glucose.

- **Le NAD(P)H** est un autre messenger mitochondrial potentiel dans le cadre du métabolisme du glucose par la mitochondrie. En effet, lors d'une stimulation par le glucose ou par un autre secrétagogue métabolisable de l'insuline, le ratio NAD(P)H/NADP varie. D'autre part, l'inhibition de la production du NAD(P)H est corrélée avec une réduction de la sécrétion d'insuline (Hedekov *et al.* 1987). Ce mécanisme impliquerait le recyclage du pyruvate au travers de la membrane mitochondriale (Lu *et al.* 2002), suggérant l'importance de ce messenger mitochondrial dans la régulation de la sécrétion, étant donnée la coexistence de nombreux systèmes de recyclage du pyruvate et de production de NAD(P)H dans la cellule β (MacDonald 1993).

- Phase distale : excitabilité membranaire et déclenchement de l'exocytose

La synthèse d'ATP lors du métabolisme du glucose dans la cellule β , et la diminution concomitante d'ADP, résulte en une augmentation du ratio ATP/ADP dans le cytosol. Cela entraîne la fermeture d'un canal membranaire, le canal potassique ATP-dépendant : K_{ATP} . Au repos, la membrane plasmique de la cellule β est polarisée (-70 mV), et ce potentiel de repos est presque entièrement dû à l'activité du K_{ATP} , qui laisse circuler un flux hyperpolarisant constant d'ions K^+ de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane plasmique. Pour des taux de glucose inférieurs à 5 mM, bien que l'activité des canaux K_{ATP} soit réduite à de 75–95%, l'activité restante (5–25% de la conductance totale des K_{ATP}) suffit à maintenir le potentiel de repos (Ashcroft & Rorsman 1989, Smith *et al.* 1990). Une augmentation du ratio ATP/ADP supprime la totalité de l'activité des canaux K_{ATP} qui sont alors fermés, ce qui induit une dépolarisation de la membrane en raison de la perte de la force d'hyperpolarisation que constituait le flux K^+ . Cette dépolarisation, supérieure à -55 mV, conduit à la génération d'une activité électrique sous la forme d'ondes lentes de dépolarisation d'une période de 5–10 minutes (Henquin *et al.* 1982, Beauvois *et al.* 2006) sur lesquelles sont superposées des bouffées de potentiels d'action. La dépolarisation amène le potentiel membranaire au-delà du seuil d'activation de canaux dépendants du potentiel présents à la membrane plasmique, parmi lesquels des canaux calciques voltage-dépendants (voltage-dependent calcium channels, VDCC)

qui, par conséquent, s'ouvrent (Braun *et al.* 2008). Se déclenche alors un flux d'ions Ca^{2+} entrant dans le cytosol de la cellule β . Étant donné l'ampleur et le sens du gradient, ces mouvements ioniques résultent en une augmentation considérable de la concentration intracytosolique de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), ce qui déclenche l'exocytose des granules d'insuline (Rorsman 1997). Cette séquence d'évènements est déclenchée pour une concentration de glucose supérieure à 5 mM chez l'Homme (Braun *et al.* 2008) et à 7 mM chez la souris (Ashcroft & Rorsman 1989).

L'activité électrique des cellules β est donc glucose-dépendante et est intimement liée à la sécrétion d'insuline : en effet, Dean et Matthews, qui ont été les premiers à mettre en évidence l'activité électrique des cellules β (Dean & Matthews 1968), ont montré que les potentiels d'action corrélaient avec l'exocytose des granules d'insuline (Dean & Matthews 1970a, Dean & Matthews 1970b). Le potentiel d'action reflète les ouvertures et fermetures séquentielles des différents canaux ioniques voltage-dépendants présents à la membrane de la cellule β , et qui s'activent à différents potentiels membranaires (Braun *et al.* 2008). L'activité électrique des cellules β ainsi que les canaux ioniques impliqués dans sa génération sont des éléments cruciaux dans le couplage entre la détection du glucose et la sécrétion d'insuline, et seront abordés plus en détail dans le chapitre 4 qui leur sera consacré.

3.3.2. Les modulations de la sécrétion d'insuline

○ Voie déclenchante et voie amplificatrice

De nombreuses études indiquent que le glucose induit et amplifie la sécrétion d'insuline par deux voies de signalisation différentes (*Figure 11*). La voie sans laquelle il ne peut y avoir de sécrétion d'insuline est appelée la voie déclenchante (ou voie K_{ATP} -dépendante) et est provoquée par l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Le Ca^{2+} est central dans le déclenchement de l'exocytose car l'augmentation des concentrations intracellulaires de calcium est indispensable à la fusion des vésicules sécrétoires à la membrane plasmique. Cependant, le signal calcique n'est pas assez intense, assez soutenu ni assez flexible pour faire face aux besoins physiologiques. Des études sur cellules clonales perméabilisées ont montré que si l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ était suffisante pour déclencher une réponse sécrétoire, cette dernière est potentialisée en présence d'AMPC (Vallar *et al.* 1987).

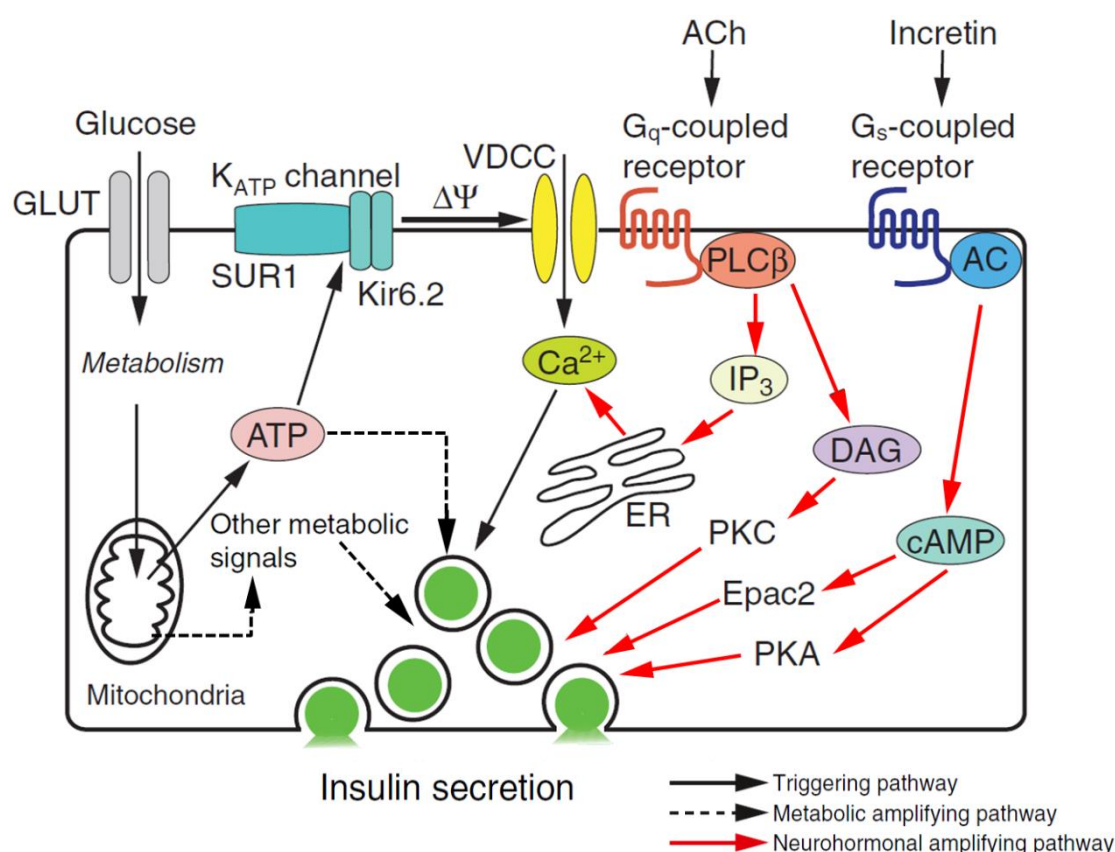


Figure 11 : La voie déclenchante et les voies amplificatrices de la sécrétion de l'insuline

La voie déclenchante repose sur l'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} consécutive à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) suite à la dépolarisation membranaire causée par l'ouverture des canaux K_{ATP} . En plus de cette voie déclenchante K_{ATP} -dépendante, des signaux métaboliques générés par le métabolisme du glucose amplifient la sécrétion d'insuline: il s'agit de la voie amplificatrice métabolique, ou voie K_{ATP} -indépendante. La sécrétion d'insuline est également amplifiée par l'action d'hormones ou de neurotransmetteurs qui génèrent des signaux intracellulaires tels que l'AMPc, le diacylglycérol (DAG) et l' IP_3 . On parle alors de voie amplificatrice neurohormonale. PKA, phosphokinase A; $\text{PLC}\beta$, phospholipase C- β ; AC, adénylate cyclase; ACh, acétylcholine; ER, réticulum endoplasmique. D'après Seino *et al.* (2010) et Seino (2012).

Ainsi, d'autres facteurs issus du métabolisme du glucose agissent pour amplifier la réponse sécrétoire élicitée par le signal déclencheur qu'est l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cette seconde voie, dite amplificatrice métabolique (ou voie K_{ATP} -indépendante), compte pour 50% de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Mourad *et al.* 2010). Plusieurs candidats métaboliques semblent jouer un rôle dans cette voie amplificatrice, cependant leur importance physiologique n'a pas été déterminée, et d'autres acteurs non identifiés à ce jour pourraient également intervenir. De plus, leurs mécanismes d'action sont plus complexes que ceux de la

voie déclenchante. Ces signaux métaboliques agissent indépendamment de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ elle-même, celle-ci étant néanmoins nécessaire à la voie amplificatrice, qui n'a pas lieu si la voie déclenchante n'est pas opérationnelle (Gembal *et al.* 1993). Elle fut mise en évidence en découplant le métabolisme du glucose de la sécrétion d'insuline en maintenant le canal K_{ATP} ouvert (utilisation de diazoxide), puis augmentant la $[Ca^{2+}]_i$ à l'aide d'une dépolarisation membranaire induite par une stimulation au KCl, provoquant ainsi une réponse sécrétoire. Une augmentation du glucose dans ces conditions augmente la sécrétion d'insuline sans modifier la $[Ca^{2+}]_i$ déjà élevée (Gembal *et al.* 1992) suggérant ainsi l'existence d'une voie indépendante du déclencheur calcique pouvant influencer sur la sécrétion (Henquin 2000, Henquin 2009, Henquin 2011).

Parmi les mécanismes supposés de la voie amplificatrice métabolique, la voie de l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) est la mieux caractérisée. L'AMPC est produit à partir de l'ATP par l'adénylate cyclase (AC) et agit sur la sécrétion d'insuline par deux voies distinctes : la première implique l'activation de la PKA (voie PKA-dépendante), qui phosphoryle ensuite diverses protéines associées au processus de sécrétion et augmente la mobilisation des granules d'insuline et ainsi le nombre de vésicules délivrables (Seino & Shibasaki 2005). La seconde voie est dite PKA-indépendante, et implique l'activation d'Epac2A (exchange protein activated by cAMP), qui interagit par la suite avec la GTPase Rap1 (Ras-related protein 1) ou encore avec Rim2 α (rab interacting molecule). Rim2 α interagit avec diverses protéines impliquées dans l'exocytose, telles que la synaptotagmine 1, tandis que la voie Epac2A-Rap1 agit en augmentant le nombre de vésicules délivrables, contribuant ainsi à augmenter la sécrétion d'insuline (Seino *et al.* 2011, Seino 2012). Outre l'AMPC, d'autres facteurs de couplage mitochondriaux ont été proposés pour expliquer les mécanismes d'amplification de la sécrétion d'insuline, tels que le glutamate ou encore le NADH et les LC-CoA que nous avons abordés plus tôt (Henquin 2011).

Une autre voie d'amplification, dite la voie amplificatrice neurohormonale, est activée sous l'action de signaux hormonaux tels que les incrétines GLP-1 et GIP, ou neuronaux tels que le VIP ou le PACAP, qui potentialisent la sécrétion d'insuline en agissant au niveau de leur récepteur couplé à une protéine G, qui active l'AC et ainsi la production d'AMPC, stimulant les voies amplificatrices PKA-dépendante et PKA-indépendante. La cellule β exprime 8 isoformes de l'AC, les AC 1 à 8 ; chez le rongeur, l'effet potentialisateur du GLP-1 passe par l'activation de l'AC8, qui est importante pour le maintien de la glycémie étant donné qu'elle

est nécessaire pour la signalisation calcique induite par le glucose dans la cellule β (Roger *et al.* 2011, Raoux *et al.* 2014, Dou *et al.* 2015). L'effet amplificateur du GLP-1 via l'AMPC compte pour plus de la moitié de la réponse physiologique au glucose (Gromada *et al.* 1997, Gromada *et al.* 1998). D'autres mécanismes d'amplification, comme celui déclenché par l'acétylcholine par exemple, impliquent la conversion du PIP_2 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en IP_3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) par la phospholipase C (PLC), recrutant ainsi les stocks de calcium intracellulaires du réticulum endoplasmique pour augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Gilon & Henquin 2001).

Les voies amplificatrices sont cruciales dans la réponse sécrétoire de la cellule β au glucose. En effet, il a été montré que de petites augmentations successives par paliers de la concentration de glucose de 2,8 à 12,5 mM ne déclenchaient pas la sécrétion d'insuline dans le pancréas de souris perfusé, tandis qu'en présence de GLP-1 ou d'un analogue de l'AMPC, la sécrétion d'insuline était induite (Fujimoto *et al.* 2009).

- Les inhibiteurs de la sécrétion d'insuline

En situation physiologique, la sécrétion d'insuline doit parfois être inhibée afin d'assurer un apport de glucose suffisant aux organes utilisateurs, comme par exemple lors d'un exercice physique. Ainsi, certains agents moléculaires vont non pas amplifier, mais atténuer l'intensité de la réponse sécrétoire au glucose. Il s'agit des neuromédiateurs libérés par les afférences nerveuses sympathiques, notamment la noradrénaline ou le NPY, mais également des hormones circulantes, comme l'adrénaline qui agit conjointement avec le système nerveux sympathique pour moduler la réponse des îlots en situation de stress, ou encore des hormones insulaires agissant par voie paracrine comme la somatostatine (Magnan & Ktorza 2005). L'adrénaline et la noradrénaline par exemple agissent sur la cellule β via le récepteur α_2 -adrénergique, en exerçant leur effet soit par l'intermédiaire de l'AC, soit directement au niveau de l'exocytose (Ullrich & Wollheim 1988, Lang *et al.* 1995, Renstrom *et al.* 1996).

3.3.3. Dynamique de la sécrétion d'insuline

- L'exocytose des granules d'insuline

L'insuline est libérée dans le milieu extracellulaire à l'issue de l'exocytose, qui,

comme c'est le cas pour l'exocytose des neurotransmetteurs par les neurones, implique plusieurs étapes incluant le rapprochement des vésicules contenant l'insuline vers la membrane plasmique (recrutement), l'arrimage à la membrane plasmique (docking), la préparation (priming) et la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique (Hay & Martin 1992, Eliasson *et al.* 2008). Ce processus d'exocytose implique une cinquantaine de protéines différentes dont les protéines de la famille SNARE (Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) qui jouent un rôle majeur dans l'étape de fusion membranaire finalisant l'exocytose. Les protéines SNARE sont retrouvées dans tous les types cellulaires neuroendocrines. Ces protéines sont localisées dans toutes les membranes cellulaires : ainsi dans le contexte de l'exocytose, les protéines SNARE se retrouvent à la membrane vésiculaire ainsi que sur la membrane plasmique cible. Ces protéines permettent de rapprocher les membranes vésiculaire et plasmique en formant complexe composé de leurs domaines cytosoliques, nommé le complexe SNARE. Dans la cellule β , les protéines impliquées dans la formation du complexe SNARE sont la SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein 25) (Sadoul *et al.* 1995), la synaptobrevine aussi appelée VAMP-2 (Vesicle-associated membrane protein 2) (Regazzi *et al.* 1995), et la syntaxine 1 (Lang *et al.* 1997b).

La dynamique du complexe SNARE est finement régulée par différents acteurs protéiques permettant d'opérer une fusion optimale suite à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, parmi lesquels la synaptotagmine dont l'activité est régulée par le calcium (Lang *et al.* 1997a). La synaptotagmine est à ce jour le seul détecteur de calcium identifié dans la machinerie exocytotique de la cellule β ; il est possible que d'autres protéines puissent jouer ce rôle, mais celles-ci ainsi que leur mode d'action n'ont pas encore été déterminés (Holz *et al.* 1991, Sudhof & Rothman 2009, Sudhof 2013). De même, l'exocytose rapide en réponse au Ca^{2+} est permise par la localisation des VDCC au niveau des sites d'exocytose. Cette concentration des VDCC au niveau d'une part restreinte de la membrane plasmique assure que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ transitoire est maximale à proximité des vésicules d'insuline pour rapidement initier l'exocytose tout en limitant dans le même temps les dépenses énergétiques nécessaires pour restaurer la $[Ca^{2+}]_i$ basale (Bokvist *et al.* 1995). De plus, il a été montré que les VDCC sont physiquement associés à la synaptotagmine ainsi qu'aux protéines SNARE syntaxine et SNAP-25 au sein d'un complexe multiprotéique nommé excitosome qui est essentiel pour l'exocytose induite par la dépolarisation de la membrane (Wiser *et al.* 1999).

- La sécrétion d'insuline suit un profil biphasique

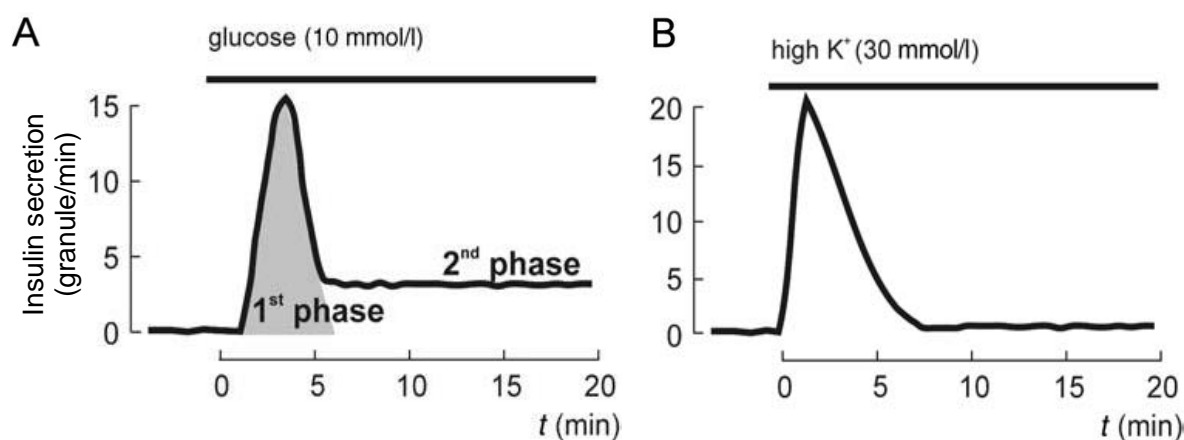


Figure 12 : La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est biphasique.

A: Représentation schématique de la sécrétion d'insuline induite par une application continue de glucose extracellulaire à 10 mM. La sécrétion d'insuline est déclenchée avec un délai de ~1 minute (le temps nécessaire à la métabolisation du glucose), puis suit une cinétique biphasique. **B:** Représentation schématique de la sécrétion d'insuline induite par une stimulation avec 30 mM de K⁺. La réponse sécrétoire est ici immédiate et ne comporte qu'une seule phase. D'après Rorsman et al. (2000).

Lors d'une augmentation soudaine et soutenue de la concentration extracellulaire de glucose, l'insuline est sécrétée par les cellules β en suivant une cinétique biphasique : le premier pic de sécrétion (ou « pic précoce », correspondant à la première phase de sécrétion), d'une durée de 4 à 10 minutes, est suivi par une augmentation progressive et moins élevée (« pic tardif » ou deuxième phase de sécrétion) de la sécrétion d'insuline jusqu'à atteindre une valeur d'équilibre qui se maintient dans le temps jusqu'à l'arrêt de la stimulation glucidique (Figure 12.A) (Curry et al. 1968, Rorsman & Renstrom 2003, Henquin 2009). Cette sécrétion biphasique est un phénomène expérimental, qui est observé *in vivo* au cours d'expériences de clamp hyperglycémique (consistant à infuser continuellement une solution de glucose dans la circulation sanguine d'un animal/sujet afin de fixer sa glycémie à une valeur désirée), et *in vitro* sur des îlots ou pancréas isolés perfusés. Il a été montré que seuls les secrétagogues énergétiques tels que le glucose étaient capables d'induire à la fois la première et la seconde phase de la sécrétion d'insuline, au contraire des sulfonylurées ou du KCl par exemple qui n'induisent qu'une réponse sécrétoire monophasique (Figure 12.B) (Henquin 2000). Dans le DT2, les deux phases de la sécrétion d'insuline sont touchées, mais la perte du pic précoce

s'observe dès les phases précoces du DT2 (dites pré-diabète) ainsi que chez les personnes intolérantes au glucose (Porte 1991).

La signification physiologique de cette sécrétion biphasique n'est pas encore clairement élucidée, mais il semble que le rôle du pic précoce est de sensibiliser les tissus cibles aux effets de l'insuline afin de permettre une meilleure captation du glucose grâce à l'augmentation rapide de la sécrétion d'insuline au cours de cette phase, et la chute rapide de la sécrétion d'insuline permettrait également d'éviter une hyperinsulinémie trop prononcée qui pourrait provoquer une hypoglycémie réactionnelle (Magnan & Ktorza 2005).

Du point de vue mécanistique, la sécrétion biphasique reste encore incertaine, bien qu'un modèle consensus ait émergé, selon lequel les deux phases reposeraient sur des pools vésiculaires différents, affrétés à la membrane plasmique selon des cinétiques distinctes.

- Les différents pools de vésicules d'insuline et leur mobilisation

Il a été suggéré que les ~10 000 vésicules sécrétoires sont réparties en plusieurs pools distincts, et que la libération séquentielle de ces pools serait responsable de la sécrétion biphasique de l'insuline (Rorsman & Renstrom 2003). Les cellules β contiennent au moins deux pools distincts de granules sécrétoires : un pool de réserve (reserve pool – RP), qui représente la majorité des vésicules sécrétoires, et un pool rapidement délivrable (readily releasable pool – RRP) comprenant le reste des vésicules (<5%, soit ~100 vésicules), parmi lesquels une petite quantité de vésicules (~50), constituant un pool immédiatement délivrable (immediately releasable pool – IRP), est située en proximité directe de VDCC, et peut donc être délivrée dès l'ouverture de ceux-ci, contrairement au reste du RRP (Barg *et al.* 2002). Ces pools se différencient par leur cinétique de sécrétion, mise en évidence grâce à l'étude en temps réel de la capacité membranaire par électrophysiologie, ainsi que par leur position vis-à-vis de la membrane plasmique (Olofsson *et al.* 2002). Ainsi, la première phase de la sécrétion d'insuline serait causée par la libération des vésicules du IRP, puis par celles du RRP déjà arrimées à la membrane, et la seconde phase serait due à la mobilisation de nouvelles vésicules depuis le RP, qui alors s'arrimeraient à la membrane avant de fusionner (*Figure 13.A*) (Rorsman *et al.* 2000).

De récentes études utilisant la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) ont apporté de nouvelles indications quant à la dynamique de sécrétion des vésicules d'insuline. La microscopie TIRF permet d'exciter des fluorophores dans un environnement

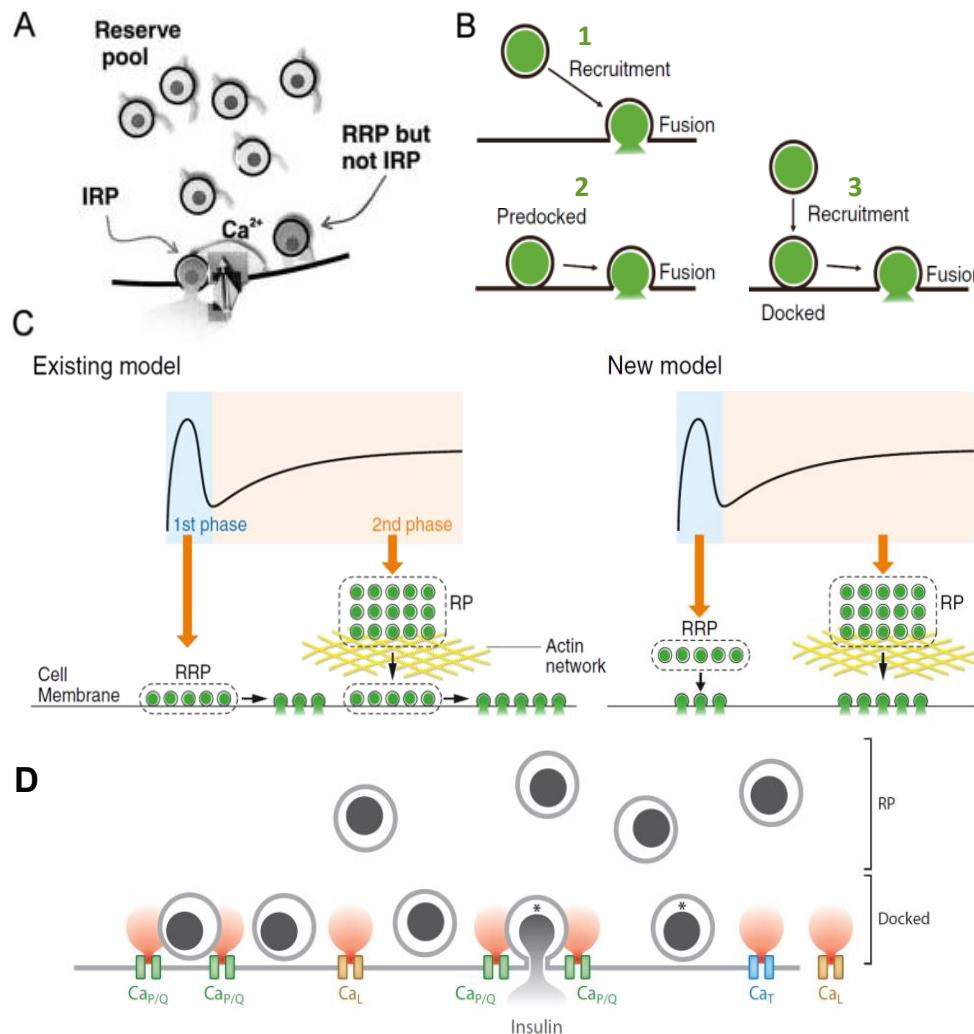


Figure 13 : Les pools vésiculaires impliqués dans la sécrétion biphasique d'insuline

A: Les granules d'insuline appartiennent soit au RRP ou au RP. La transition (ou « priming ») du RP vers le RRP implique une translocation physique et/ou une modification chimique des vésicules sécrétoires. Dans les cellules β , la majorité des granules du RRP sont situés en proximité immédiate (< 10 nm) des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (VDCC). Ces granules (IRP) sont instantanément exposés à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ lors de l'ouverture des canaux calciques et sont donc libérés avec une latence minimale. **B:** Il existe différents modes d'exocytose des granules d'insuline. **1.** le mode « old face » représente des granules déjà arrimés qui fusionnent avec la membrane lors d'une stimulation. **2.** Dans le mode « restless newcomers », les granules sont nouvellement recrutés lors d'une stimulation et fusionnent directement avec la membrane. **3.** Le dernier mode « resting newcomers » représente des granules qui sont nouvellement recrutés à la membrane puis arrimés, et fusionnent ensuite lors d'une stimulation. **C:** Deux modèles visent à expliquer la dynamique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Dans le modèle existant, la première phase de la sécrétion d'insuline résulte du RRP comprenant des vésicules arrimées à la membrane; la seconde phase résulte du RP comprenant des vésicules localisées à une distance plus lointaine de la membrane, qui sont nouvellement recrutées, arrimées, puis fusionnent. Dans le nouveau modèle, les deux phases sont causées par des granules nouvellement recrutés lors de la stimulation et qui fusionnent immédiatement à la membrane, sans étape d'arrimage. **D:** Dans les îlots humains, seules les vésicules du RRP situées à proximité des VDCC et exposées au gradient élevée de Ca^{2+} subissent l'exocytose durant l'augmentation brève et localisée de $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à un potentiel d'action. **A** d'après Barg et al. (2002), **B** et **C** d'après Seino (2012), **D** d'après Rorsman et Braun (2013).

liquide ou cellulaire au voisinage direct (≤ 200 nm) d'une surface solide sans exciter les fluorophores plus lointains. Cette propriété permet ainsi d'observer les événements de fusion à la membrane plasmique par l'utilisation de marqueurs vésiculaires adaptés. Ainsi, il a été montré que l'exocytose des granules d'insuline se fait en deux modes : un mode dans lequel des granules déjà arrimés à la membrane fusionnent (« old face »), et un autre mode durant lequel les granules sont nouvellement recrutés à la membrane avant de fusionner (« newcomers »), ces dernières vésicules pouvant soit fusionner immédiatement à leur arrivée à la membrane (« restless newcomers »), soit sont d'abord arrimées, puis ensuite seulement fusionnent (« resting newcomers ») (*Figure 13.B*) (Shibasaki *et al.* 2007). Ainsi, un nouveau modèle de la dynamique de l'exocytose des granules d'insuline a été proposé : dans le modèle existant, les granules du RRP subissant l'exocytose étaient supposés être déjà arrimés à la membrane, c'est-à-dire être des granules « old face », tandis que la seconde phase impliquait l'arrimage de nouvelles vésicules depuis le RP, qui fusionnaient ensuite (« resting newcomers »). Le nouveau modèle proposé par Seino *et al.* (2011) suggère que l'exocytose des vésicules du RRP responsables de la première phase, ainsi que celle des vésicules du RP recrutées lors de la deuxième phase se fait selon un mode « restless newcomers », par l'arrivée de nouvelles vésicules non arrimées à la membrane, qui fusionnent alors directement (*Figure 13.C*).

En revanche, la dynamique de l'exocytose varie en fonction de la stimulation, étant donné que les vésicules libérées durant une stimulation au KCl sont uniquement des granules déjà arrimés. Cela s'explique par le fait qu'une dépolarisation induite par le KCl déclenche uniquement un influx calcique (l'étape distale de la voie déclenchante). Une stimulation au glucose, au contraire, fait intervenir également les voies amplificatrices, dont les mécanismes pourraient alors expliquer ces différents mode d'exocytose (Seino 2012).

Au contraire de ce qui est observé dans les cellules β de rongeurs (Seino *et al.* 2011), les études en microscopie TIRF ont confirmé que, dans les cellules β humaines, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose implique principalement des vésicules localisées à proximité de la membrane plasmique. De plus, la première phase de la sécrétion d'insuline ne concernerait que 10% des granules arrimés à la membrane, soit moins de 30% du RRP total. La plupart des granules arrimés dans les cellules β humaines ne serait pas disponibles pour l'exocytose car ils n'auraient pas encore gagné leur compétence de libération, ou bien parce qu'ils seraient trop éloignés des canaux calciques voltage-dépendants et ne seraient donc pas sous l'influence du gradient transitoire de Ca^{2+} localisé autour des canaux calciques lors de leur ouverture

(Michael *et al.* 2007). Cependant, les mécanismes sous-tendant la sécrétion biphasique de l'insuline dans les îlots humains demeurent mal connus et méritent d'être davantage étudiés (Rorsman & Braun 2013).

4. LES CANAUX IONIQUES DE LA CELLULE β

4.1. Généralités

Comme la plupart des cellules sécrétrices, les cellules endocrines des îlots pancréatiques sont excitables. Lors d'un stimulus physique ou chimique d'intensité suffisante, une cellule excitable répond en développant un signal bioélectrique appelé le potentiel d'action, suite à une dépolarisation de sa membrane au-dessus de son potentiel de repos.

Toute cellule vivante possède une distribution inégale de particules chargées de part et d'autre de sa membrane plasmique : l'intérieur de la cellule comprend plus de charges négatives (portées par les protéines et des anions tels que le Cl^-) que le liquide extracellulaire, qui au contraire comprend plus de charges positives (portées par des espèces cationiques telles que K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} parmi tant d'autres). Il existe donc une différence de potentiel entre les espaces intra- et extracellulaire : on dit que la membrane est polarisée.

Ce déséquilibre de charge entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule résulte d'un mécanisme de pompage actif (par la Na^+/K^+ -ATPase entre autres, qui fait entrer deux ions K^+ dans la cellule en faisant sortir trois ions Na^+). Ce gradient électrochimique entretenu, ainsi que la perméabilité particulière de la membrane à certains ions, définissent le potentiel de celle-ci. En effet, la membrane plasmique est dotée de diverses protéines constituant des canaux permettant le passage plus ou moins sélectif des ions : ce sont les canaux ioniques.

Chaque espèce ionique (principalement Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^-) diffuse au travers de ces canaux dans le sens de son gradient électrochimique afin de rétablir un équilibre de concentration entre les deux côtés de la membrane. Les ions étant des particules chargées, leur déplacement ne sera pas seulement influencé par le gradient de concentration mais également par la présence d'un champ électrique transmembranaire. Chaque ion possède un potentiel d'équilibre, pour lequel le courant de diffusion (c'est-à-dire selon le gradient de concentration) de l'ion considéré est en équilibre avec son courant de conduction (c'est-à-dire selon le gradient électrique). Le potentiel d'équilibre des différents ions dépend de la perméabilité de la membrane pour chaque ion, c'est-à-dire des canaux ioniques présents dans cette membrane.

Un ion tendra toujours à diffuser jusqu'à atteindre son potentiel d'équilibre. Celui-ci détermine donc le sens du courant de l'ion en question.

Pour générer une activité électrique, les cellules excitables sont dotées de canaux particuliers qui s'activent et s'inactivent en fonction du potentiel de la membrane (Figure 14). Ces canaux sont dits voltage-dépendants. Les propriétés d'activation et d'inactivation des canaux voltage-dépendants dépendent de leurs caractéristiques moléculaires et sont propres à chaque canal. Ainsi, l'ouverture et la fermeture séquentielle ainsi que les propriétés d'activation et d'inactivation des canaux ioniques équipant la membrane plasmique permettent la génération d'un signal dynamique transitoire modulé par l'activité conjointe des différents canaux. Cela aboutit à l'induction du signal calcique intracellulaire par un flux entrant d'ions Ca^{2+} au travers de canaux calciques. La répartition spatiale des canaux voltage-dépendants dans la membrane permet de coupler le signal électrique de ces cellules à leur fonction, notamment dans les neurones ou dans les cellules endocrines où les canaux calciques voltage-dépendants sont couplés à la machinerie d'exocytose. La libération de neurotransmetteurs ou d'hormones se fait donc lors du déclenchement d'un potentiel d'action.

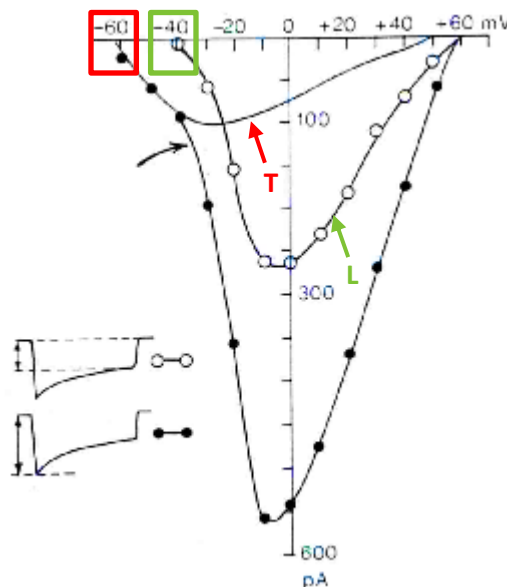


Figure 14: Différents potentiels d'activation des canaux calciques voltage-dépendants

Les relations courant-potential des courants calciques total (●), dus aux canaux de type L (○), ou de type T (sans symbole). Les canaux de type T s'activent dès -60 mV tandis que les canaux de type L s'activent à partir de -40 mV.

Les variations de la concentration intracellulaire de calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) constituent un signal central dans le fonctionnement de toutes les cellules de l'organisme en raison de la diffusion facile et rapide des ions Ca^{2+} qui, de plus, ne sont pas métabolisés. L'arrêt rapide du

signal calcique par chélation des ions Ca^{2+} ou par leur pompage actif hors du cytosol permet une modulation dynamique du signal, et donc un codage de l'information et de la réponse sécrétoire. Ainsi, le signal calcique participe à la régulation à court terme de tout un panel d'évènements moléculaires tels que l'exocytose, l'endocytose, la phosphorylation protéique et intervient également à plus long terme dans la régulation de l'expression génique, la différenciation, le métabolisme, la croissance et même dans la mort cellulaire.

4.2. Importance physiologique dans la cellule β

L'insuline, sécrétée par la cellule β , est une hormone extrêmement puissante qui ne doit pas être libérée en absence de nutriments dans le sang, sous peine de causer une hypoglycémie, une situation dangereuse pour l'organisme car elle peut, si elle est prolongée, causer un coma puis la mort (*cf.* chapitre 1, partie 1.1). Le déclenchement de l'exocytose des vésicules d'insuline, par l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans la cellule β , doit donc être finement régulé afin de correspondre aux besoins de l'organisme. La cellule β est électriquement excitable (Dean & Matthews 1968, Henquin & Meissner 1984) et utilise les variations de son potentiel membranaire pour coupler son activité métabolique (qui reflète les taux extracellulaires de nutriments, en particulier du glucose) à l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ashcroft & Rorsman 1989, Rorsman *et al.* 2011, Rorsman & Braun 2013). Ces variations reflètent l'activation et l'inactivation de différents flux ioniques qui s'opèrent entre les milieux intra- et extracellulaires par l'intermédiaire de canaux ioniques membranaires. Comme nous allons le voir, ces canaux permettent une dépolarisation de la membrane qui provoque *in fine* l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants par lesquels le calcium pénètre dans le cytosol de la cellule β . La dynamique du signal calcique dépend également de la repolarisation de la membrane : celle-ci implique l'inactivation des canaux dépolarisants ainsi que l'activation de canaux potassiques, et permet l'arrêt de l'influx de Ca^{2+} .

Cette dynamique est essentielle pour la régulation précise de l'exocytose dans le temps, ainsi que pour le bon fonctionnement cellulaire, un excès de Ca^{2+} intracellulaire étant toxique pour les cellules. À plus long terme, le signal calcique régule également l'expression génique, préparant ainsi la cellule β au prochain repas, et permettant le maintien de l'état différencié de la cellule β .

Des études électrophysiologiques par patch-clamp ont montré que la cellule β est équipée de multiples canaux ioniques (~50) (Ashcroft & Rorsman 1989, Rorsman *et al.* 2011). Nous aborderons essentiellement ici les canaux principaux impliqués dans la séquence des événements ioniques aboutissant à l'influx calcique.

L'isolation des îlots du parenchyme exocrine du pancréas est techniquement difficile en raison de la présence des enzymes digestives qui peuvent altérer les îlots, situation éprouvée par Banting et Best lors de leurs tentatives d'extraction de l'insuline. De plus, afin de garantir la meilleure qualité possible dans la préparation des îlots, ceux-ci sont triés du tissu exocrine par repiquage manuel. En dépit de ces contraintes méthodologiques, la majorité des données consistantes acquises sur la régulation de la sécrétion d'insuline provient d'études réalisées sur des cultures de cellules β primaires de rongeurs, plus particulièrement de souris, car les lignées clonales de cellules β , bien que plus faciles d'utilisation, ne représentent pas exactement les mécanismes physiologiques qui ont véritablement lieu dans la cellule β .

L'utilisation récente d'îlots humains à fins thérapeutiques suite à la mise en place du protocole d'Edmonton (Ryan *et al.* 2001, Bruni *et al.* 2014) a stimulé la recherche sur ces îlots humains. L'amélioration de l'isolation des îlots humains ainsi que la mise en place de divers réseaux pour l'utilisation des îlots impropres à la transplantation a accru l'accessibilité des îlots humains pour la recherche fondamentale. Cela a permis, au cours de la décennie passée, de caractériser les processus mis en jeu dans l'activité électrique des îlots humains, mettant en lumière l'existence de plusieurs différences entre la physiologie des îlots humains et les îlots de rongeurs. Cependant, le modèle standard, notamment en ce qui concerne l'étude des canaux ioniques, reste la souris en raison de la disponibilité limitée d'îlots humains et de la diversité des approches expérimentales qui sont impossibles à réaliser chez l'Homme (invalidation de gènes chez la souris par exemple).

Nous détaillerons ici les processus impliqués dans l'activité électrique des îlots de souris, modèle majoritairement utilisé dans mes travaux de thèse, en indiquant les différences majeures constatées dans les îlots humains sur lesquels j'ai également réalisé quelques expériences.

4.3. Chronologie des évènements ioniques dans la cellule β

4.3.1. Le potentiel de repos et l'initiation de l'activité électrique

En absence de glucose (5mM chez la souris, < 1mM chez l'Homme), la membrane de la cellule β est hyperpolarisée. Ce potentiel de repos, d'approximativement -70 mV, résulte des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) qui sont spontanément activés à bas glucose. L'efflux d'ions K^+ positivement chargés par ces canaux génère un excès de charges négatives dans la cellule β . À de tels niveaux de glucose, la conductance des canaux K_{ATP} est réduite de ~90%, mais l'activité restante est suffisante pour maintenir une polarisation assez élevée pour empêcher le déclenchement de l'activité électrique (Smith *et al.* 1990).

Lorsque les concentrations de glucose augmentent (~6 mM chez la souris, et dès 3 mM chez l'Homme), la conductance des canaux K_{ATP} est totalement inhibée, induisant une dépolarisation de la membrane. Lorsqu'un certain potentiel est atteint, -55 mV chez la souris (Rorsman *et al.* 2011), -60 mV chez l'Homme (Rorsman & Braun 2013), une activité régénérative se déclenche, sous la forme de dépolarisations-repolarisations rapides de la membrane, nommées potentiels d'action.

Chez la souris, dans la gamme physiologique des concentrations de glucose, l'activité électrique est organisée en oscillations du potentiel de membrane : des phases dites actives, où la dépolarisation atteint un plateau surmonté de bouffées de potentiels d'action, alternent avec des phases inactives (ou silencieuses) pendant lesquelles la membrane se repolarise (Cook *et al.* 1991). L'augmentation des taux de glucose induit une augmentation progressive de la durée des phases actives (accompagnée d'une diminution de la durée des phases silencieuses), jusqu'à atteindre une décharge continue des potentiels d'action à 20 mM de glucose (*Figure 15.A*) (Henquin & Meissner 1984). Ce patron de décharge en bouffées a souvent été étudié et quantifié au moyen du calcul de la fraction de la phase plateau (Fraction Of Plateau Phase, FOPP), qui correspond au temps passé dans la phase active sur la durée totale d'une oscillation. Cette FOPP a été montrée comme étant corrélée à la sécrétion d'insuline dans les îlots de souris (Meissner & Schmelz 1974, Ozawa & Sand 1986, Miura & Pernarowski 1995). Dans les îlots humains (*Figure 15.B*) au contraire, l'organisation des potentiels d'action en bouffées est beaucoup moins marquée (*Figure 15.C*) (Rorsman & Braun 2013).

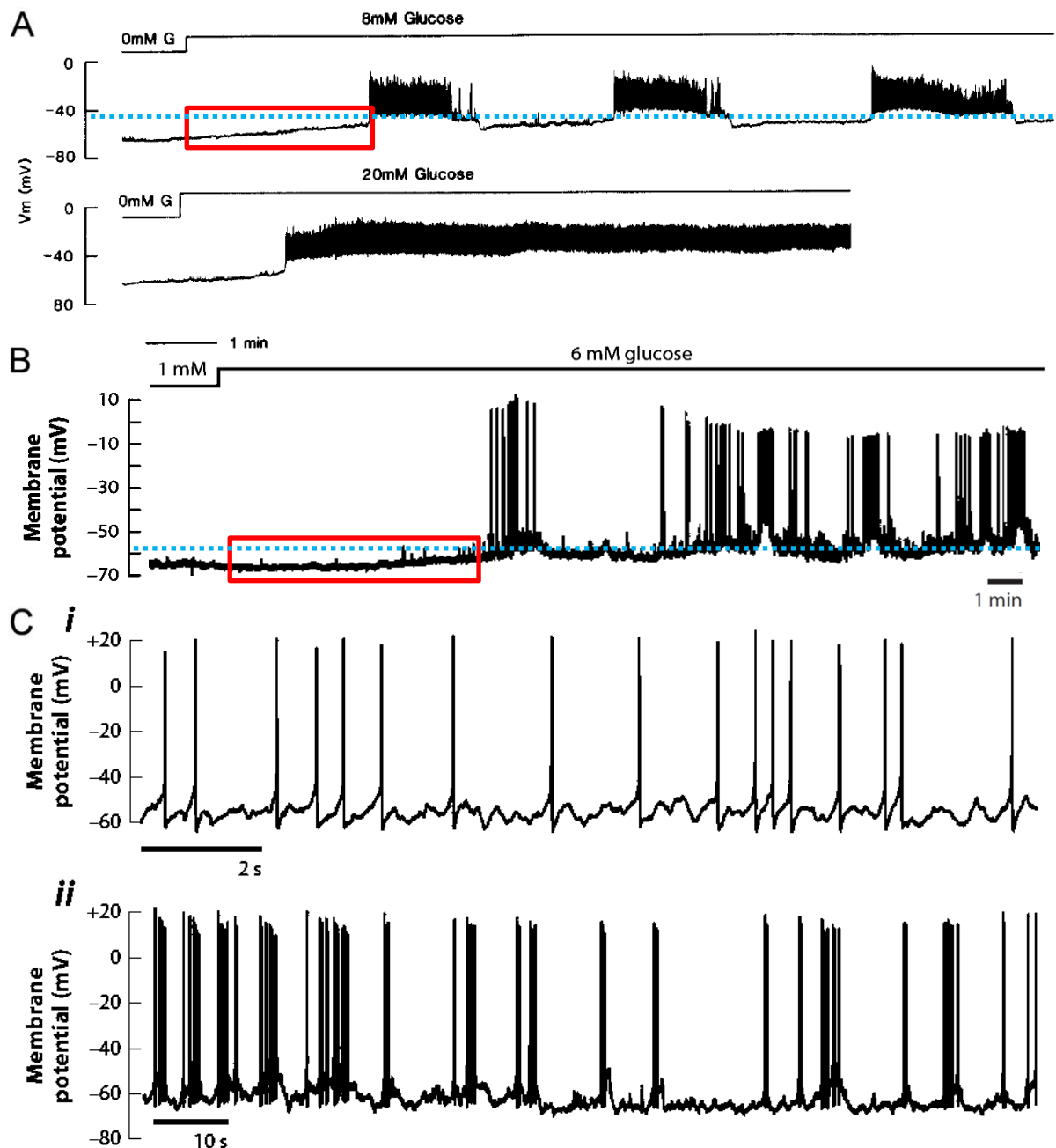


Figure 15 : Activité électrique induite par le glucose dans les îlots de souris et humains

Enregistrements en patch-clamp. **A**: Activité électrique générée en réponse à 8 mM (trace supérieure) et 20 mM (trace inférieure) de glucose par une cellule β de souris située dans un groupe de 5 cellules. **B**: Activité électrique générée en réponse à 6 mM de glucose par une cellule β humaine dans un îlot intact. La dépolarisation induite par la fermeture des canaux K_{ATP} est encadrée en rouge, le seuil de déclenchement des potentiels d'action est symbolisé par une ligne pointillée bleue. **C**: Patrons de décharge des potentiels d'action rencontrés dans les cellules β humaines: **i**. Potentiels d'action unitaires (58% des enregistrements), **ii**. Activité électrique oscillatoire (26%). **A** d'après Smith et al. (1990). **B** et **C** d'après Rorsman et al. (2011).

La fermeture des canaux K_{ATP} induit une dépolarisation de la membrane plasmique, cependant celle-ci n'est pas suffisante pour franchir le seuil de déclenchement du potentiel d'action. Néanmoins, elle active des courants ioniques entrants qui contribuent à poursuivre la dépolarisation (Ashcroft & Rorsman 1989, Rorsman *et al.* 2011). Dans les cellules β de souris, il a été suggéré que des courants entrants à la fois calciques et sodiques interviennent dans cette dépolarisation, mais les canaux impliqués n'ont pas été identifiés (Rorsman *et al.* 2011). Contrairement aux cellules β de souris, les cellules β humaines sont équipées de canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v) de type T, activés à de bas potentiels (-60 mV) (Barnett *et al.* 1995). Les Ca_v de type T les plus exprimés dans les cellules β humaines sont les $Ca_v3.2$. Le courant induit par l'ouverture de ces canaux permet d'amener le potentiel membranaire jusqu'au seuil d'ouverture de canaux activés à des potentiels plus élevés, et contribue ainsi au déclenchement du potentiel d'action (Rorsman & Braun 2013).

Tableau 1 : Les différents types de canaux calciques voltage-dépendants

Ca _v current type	HVA				LVA
	L	P/Q	N	R	T
Ca _v α_1 subunit	Ca _v 1.1, Ca _v 1.2, Ca _v 1.3, Ca _v 1.4	Ca _v 2.1	Ca _v 2.2	Ca _v 2.3	Ca _v 3.1, Ca _v 3.2, Ca _v 3.3
Biophysical properties					
Activation	Positive to -30 mV	Positive to -20 mV			Positive to -70 mV
Inactivation	Very slow $\tau > 500$ msec	Partial $\tau \approx 50-80$ msec			Complete $\tau \approx 20-50$ msec
Single channel conductance	25 pS	13 pS			8 pS
Single channel opening	Continual reopening	Long burst			Brief burst, inactivated
Relative conductance	Ba ²⁺ > Ca ²⁺	Ba ²⁺ > Ca ²⁺			Ba ²⁺ = Ca ²⁺
Blocker					
Inorganic divalent cation	Cd ²⁺ > Ni ²⁺	Cd ²⁺ > Ni ²⁺			Ni ²⁺ > Cd ²⁺
Small organic and peptide	DHP	ω -Aga IVA	ω -CTX GVIA	SNX 482	mibefradil
Localization and function					
	Excitation-contraction coupling (muscles)	Neurotransmitter release (nerve terminals)	Neurotransmitter release (nerve terminals)	Ca ²⁺ dependent action potentials (cell bodies & dendrites)	Repetitive firing (neurons, cardiac muscles and smooth muscles)
	Hormone secretion (endocrine cells)	Dendritic Ca ²⁺ transients (dendrites)	Dendritic Ca ²⁺ transients (dendrites)	Neurotransmitter release (nerve terminals)	
	Tonic neurotransmitter release (retina)				
	Gene expression				

D'après Yang et Berggren (2006).

4.3.2. Le potentiel d'action

La dépolarisation initiée par la fermeture des canaux K_{ATP} amène le potentiel de membrane au-delà du seuil de déclenchement du potentiel d'action. L'activité électrique qui s'en suit implique l'ouverture séquentielle de plusieurs canaux qui s'activent à différents voltages (Figure 16). Ces courants ioniques font partie d'une séquence précise d'évènements qui aboutissent à l'exocytose des vésicules d'insuline. Cette séquence, bien caractérisée dans les cellules β de souris (Figure 17), a été récemment décrite dans les cellules β humaines (Figure 18) et comporte plusieurs différences par rapport à celle activée chez la souris.

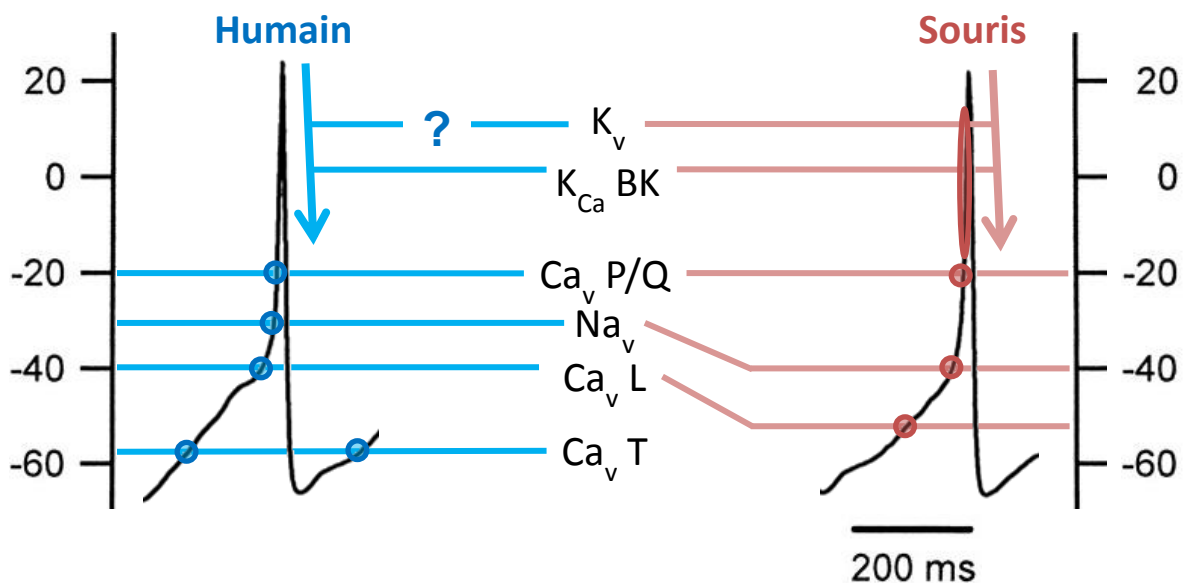


Figure 16 : Les canaux ioniques activés au cours du potentiel d'action dans la cellule β

Potentiels auxquels s'activent les différents canaux ioniques voltage-dépendants impliqués dans la dépolarisation du potentiel d'action dans la cellule β chez l'Homme et chez la souris. La repolarisation (symbolisée par une flèche descendante) est induite par l'inactivation des différents canaux dépolarisants ainsi que par l'activation de courant repolarisants portés par les canaux potassiques voltage-dépendants (K_v) et les canaux potassiques à large conductance activés par le calcium (K_{Ca} BK).

Une fois le seuil de déclenchement du potentiel d'action atteint, les canaux calciques activés à haut voltage s'ouvrent en premier lieu. Chez la souris, au moins trois types de canaux calciques voltage-dépendants sont exprimés. Les Ca_v de type L (>60 % du courant calcique) sont grandement impliqués dans le déclenchement de l'exocytose (Schulla *et al.* 2003, Gopel *et al.* 2004), bien qu'ils ne représentent pas une majeure partie de l'activité

électrique de la cellule β (Vasseur *et al.* 1987, Rosario *et al.* 1993). Les Ca_v de type R (~20% du courant calcique) seraient pour leur part impliqués dans la seconde phase de la sécrétion d'insuline (Jing *et al.* 2005). Le rôle des canaux P/Q et N (~10% du courant calcique) (Schulla *et al.* 2003) dans l'activité électrique de la cellule β humaine demeure obscure. Des canaux sodiques potentiel-dépendants (Na_v) pourraient également intervenir dans la dépolarisation du potentiel d'action chez la souris, mais le rôle des Na_v exprimés dans les cellules β de souris reste à déterminer (Rorsman *et al.* 2011).

Dans les cellules β humaines, suite à la dépolarisation induite par la fermeture des K_{ATP} et l'ouverture des Ca_v de type T, des canaux Ca_v de type L ($\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$) (Kelly *et al.* 1991, Barnett *et al.* 1995) puis des canaux Na_v (Barnett *et al.* 1995, Braun *et al.* 2008) s'activent et poursuivent la dépolarisation du potentiel d'action. Lorsque le pic du potentiel d'action (-20 mV et au-delà) est atteint, les canaux Ca_v de type P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) s'ouvrent et déclenchent l'exocytose des granules d'insuline (Kelly *et al.* 1991, Barnett *et al.* 1995, Holmkvist *et al.* 2007).

Au cours de la dépolarisation du potentiel d'action, les canaux Na_v et Ca_v de type T s'inactivent sous l'effet de l'augmentation du potentiel, tandis que les Ca_v de type L sont inactivés par l'augmentation des taux intracellulaires de calcium. Cela contribue, avec l'ouverture des canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants (K_{Ca}) à large conductance (BK), à la repolarisation du potentiel d'action (Houamed *et al.* 2010, Jacobson *et al.* 2010). Des canaux potassiques voltage-dépendants, $\text{K}_v2.1$ chez la souris (MacDonald *et al.* 2002, Jacobson *et al.* 2007), $\text{K}_v2.2$ (Herrington 2007) et hERG (Rosati *et al.* 2000) chez l'Homme, activés durant la dépolarisation du potentiel d'action, pourraient également contribuer à la repolarisation de celui-ci, cependant leur cinétique d'activation plutôt lente exclue une contribution majeure. Toutefois, leur cinétique d'inactivation étant également lente, cela pourraient contribuer à l'hyperpolarisation observée à la fin du potentiel d'action (Rorsman *et al.* 2011, Rorsman & Braun 2013). L'inactivation des canaux potassiques et la réactivation des canaux calciques déclenchent la décharge d'un nouveau potentiel d'action.

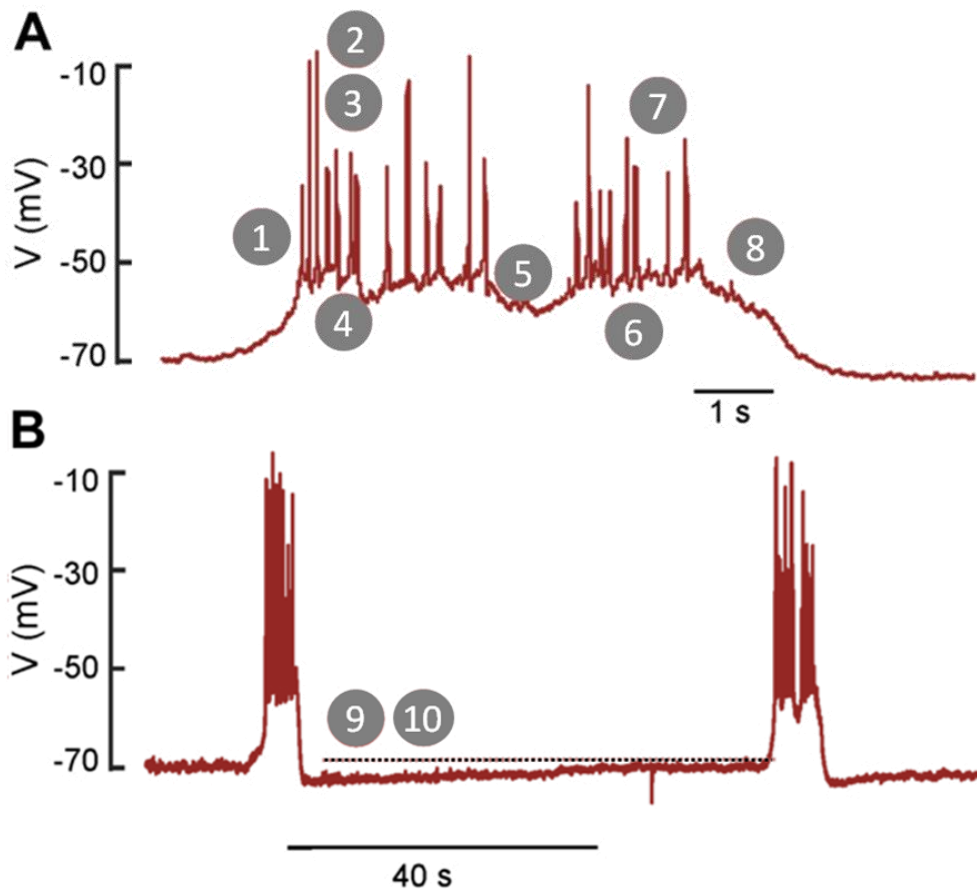


Figure 17 : Séquence des événements ioniques dans la cellule β de souris

1. L'activité électrique de la cellule β s'active suite à l'inhibition glucose-dépendante de l'activité de repos des canaux K_{ATP} . La diminution de leur conductance au K^+ démasque l'influence dépolarisante de courants entrants Ca^{2+} et/ou Na^+ , responsable de la dépolarisation de la membrane à ~ 50 mV, correspondant au potentiel de membrane auquel les canaux calciques voltage-dépendants s'ouvrent, expliquant la dépolarisation du potentiel d'action. Des canaux Na_v pourraient également être impliqués dans cette phase du potentiel d'action. **2.** L'inactivation rapide Ca^{2+} -dépendante des Ca_v ainsi que **3.** l'activation de canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants (K_{Ca}) à large conductance (BK) sous-tendent la repolarisation du potentiel d'action. **4.** L'inactivation lente des canaux potassiques voltage-dépendants $K_v2.1$, activés durant le potentiel d'action, pourraient être responsables de l'hyperpolarisation transitoire qui suit le potentiel d'action. **5.** L'activation de canaux K_{Ca} à faible conductance SK3 serait quant à elle responsable de l'hyperpolarisation séparant les groupes de 2-3 potentiels d'action. **6.** Durant l'intervalle entre deux potentiels d'action, les Ca_v se réactivent presque complètement. **7.** La désactivation des canaux potassiques ($K_v2.1$ et SK3) ainsi que la réactivation des Ca_v prépare la cellule β à un nouveau potentiel d'action, qui est déclenché quand l'influence dépolarisante du courant Ca^{2+} excède l'influence repolarisante des courants K^+ . L'inactivation voltage-dépendante cumulative des Na_v et l'inactivation Ca^{2+} -dépendante des Ca_v explique la hauteur réduite des potentiels d'action comparé à l'initiation de l'activité électrique. **8.** Ce cycle est répété plusieurs fois, jusqu'à ce que les K_{ATP} se réactivent sous l'influence de la diminution d'ATP, consommé par les pompes SERCA (activées par les influx successifs de Ca^{2+} au cours des potentiels d'action), responsable de la repolarisation de la membrane et de la fin de la bouffée de potentiels d'action. **9.** Une fois la cellule repolarisée et l'influx Ca^{2+} stoppé, la cellule β restaure un haut ratio ATP/ADP en métabolisant du glucose. **10.** La diminution progressive de l'activité du K_{ATP} ainsi que l'activité tonique de la conductance cationique dépolarisante (Ca^{2+} et/ou Na^+) explique la dépolarisation « pacemaker » observable entre deux bouffées successives. D'après Rorsman et al. (2011).

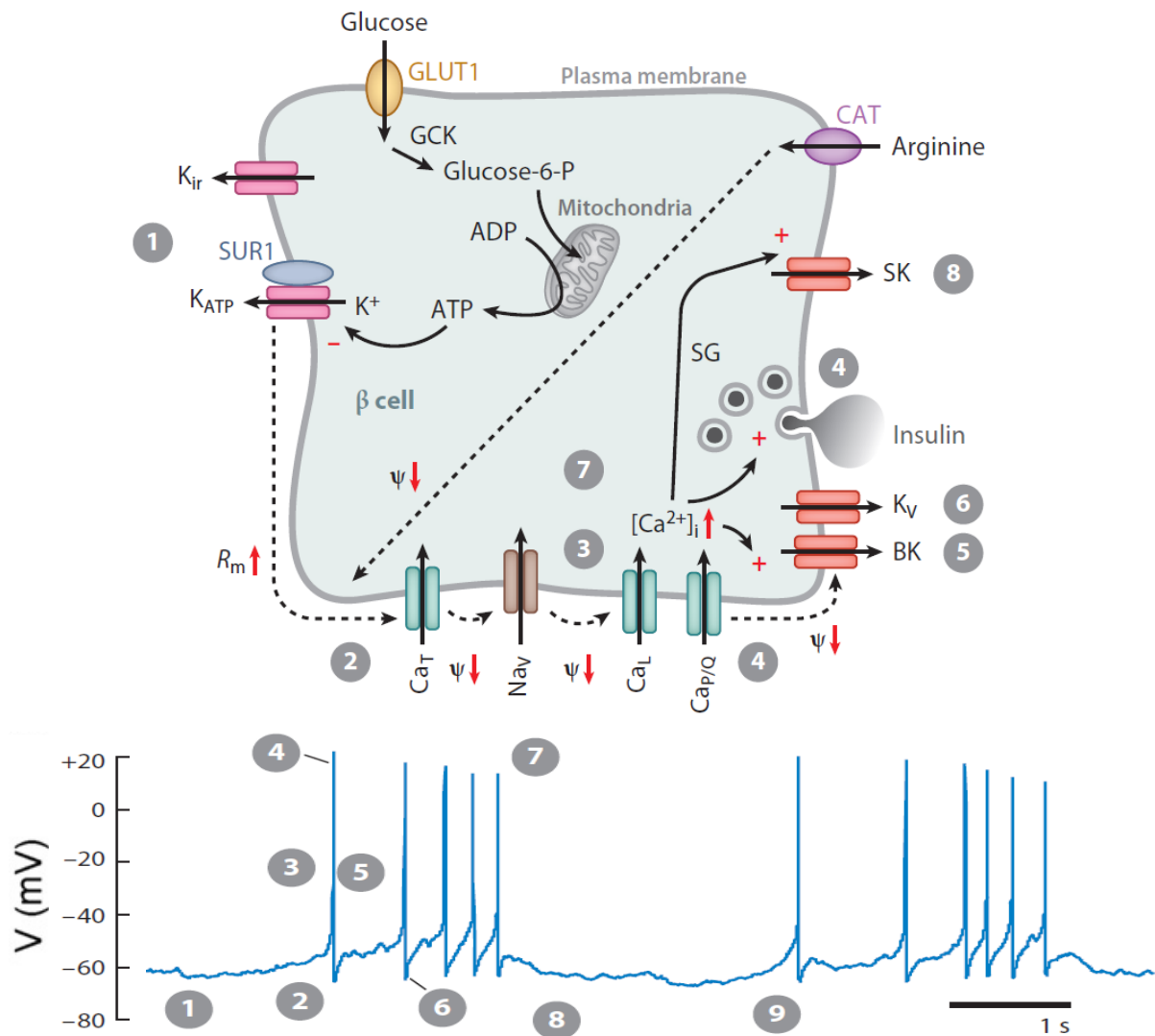


Figure 18 : Séquence des évènements ioniques dans la cellule β humaine

1. Lors d'une augmentation de glucose, celui-ci pénètre dans la cellule β par les transporteurs GLUT1. Le métabolisme du glucose (augmentation du ratio ATP/ADP) aboutit à une augmentation de la résistance de la membrane plasmique ($R_m \uparrow$) induite par la fermeture des canaux K_{ATP}. **2.** Lorsque la résistance membranaire est élevée, l'ouverture spontanée des canaux Ca_v de type T (Ca_T) dépolarise ($\psi \downarrow$) la membrane suffisamment pour activer des Ca_T supplémentaires, dépolarisant d'autant plus la membrane. **3.** Cette dépolarisation est alors éventuellement suffisante pour activer les canaux Ca²⁺ de type L (Ca_L), suivi de l'activation des canaux Na_v sensibles à la TTX. **4.** Lors du pic du potentiel d'action (-20 mV et au-delà), les canaux Ca²⁺ de type P/Q (Ca_{P/Q}) s'ouvrent et provoquent l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ qui déclenche l'exocytose des granules d'insuline. **5.** L'ouverture des Ca_{P/Q} associée à l'inactivation rapide des Na_v soutient la repolarisation du potentiel d'action. **6.** L'inactivation lente des canaux potassiques voltage-dépendants (K_v, désignant les K_v2.2 et les hERG), activés durant le potentiel d'action, pourrait être responsable de l'hyperpolarisation transitoire qui suit le potentiel d'action. **7.** L'inactivation voltage-dépendante cumulative des Na_v et l'inactivation Ca²⁺-dépendante des Ca_L explique la hauteur réduite des potentiels d'action comparé à l'initiation de l'activité électrique. **8.** L'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}) à faible conductance (SK), ou celle des K_{ATP} est due à la diminution du ratio ATP/ADP résultant de l'activation des pompes SERCA, repolarise la cellule et termine la bouffée de potentiels d'action. **9.** La restauration du ratio ATP/ADP, la diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ et la réactivation des Ca_T sont responsables de la dépolarisation « pacemaker » qui précède la survenue d'un nouveau groupe de potentiels d'action. D'après Rorsman et Braun (2013).

4.3.3. La repolarisation de la membrane à la fin de la bouffée

Chez la souris et parfois chez l'Homme, les potentiels d'action sont organisés en bouffées caractéristiques de l'activité électrique oscillatoire des cellules β . Chez les deux espèces, l'amplitude des potentiels d'action en fin de bouffée est réduite par rapport au début de l'activité électrique. Cela pourrait s'expliquer par la cinétique d'inactivation et de réactivation des canaux Na_v (inactivation voltage-dépendante en 5 millisecondes) et des canaux Ca_v de type L (inactivation Ca^{2+} -dépendante en 40 millisecondes). Ainsi au cours du temps, de plus en plus de canaux sont inactivés, et les courants résultants ne dépolarisent plus autant la membrane au cours du potentiel d'action (Rorsman *et al.* 2011, Rorsman & Braun 2013).

La repolarisation responsable de la fin de la bouffée de potentiels d'action implique plusieurs processus. L'accumulation de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule, suite à l'influx calcique au cours de potentiels d'action, active des pompes SERCA (SarcoEndoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) afin de pomper le Ca^{2+} hors du cytoplasme. Ce mécanisme consommant de l'ATP, il fait diminuer le ratio ATP/ADP dans la cellule β et induit la réactivation des canaux K_{ATP} . Cette réactivation permet en partie la repolarisation de la membrane cellulaire responsable de la fin de la bouffée de potentiels d'action. Outre cette réactivation, un autre courant potassique, nommé le K_{slow} , intervient dans la repolarisation de la membrane (Gopel *et al.* 1999, Kanno *et al.* 2002). Il est porté par l'activation de canaux K_{Ca} à faible conductance, les SK ainsi que par des canaux K_v . La repolarisation induit l'arrêt de l'influx calcique dans la cellule β . Chez la souris, il arrive que l'activité des canaux K_{ATP} continue à augmenter même après que l'influx calcique ait cessé, et cela pourrait étendre la phase silencieuse au-delà de celle induite par la seule augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cela pourrait également expliquer pourquoi le potentiel de membrane se maintient au niveau du potentiel de plateau après l'arrêt de la décharge des potentiels d'action et avant le retour au potentiel de repos (Rorsman *et al.* 2011).

4.4. Les canaux K_{ATP} et Ca_v : des acteurs cruciaux du couplage

Parmi les événements ioniques que nous venons de décrire, la fermeture du canal K_{ATP} et l'ouverture des Ca_v sont des étapes cruciales du couplage stimulus-sécrétion. En effet, le

K_{ATP} d'une part permet l'initiation de l'activité électrique et couple celle-ci au métabolisme, et les Ca_v d'autre part couplent les variations du potentiel membranaire au déclenchement de la sécrétion d'insuline. Nous allons maintenant voir quelles sont les principales régulations de ces acteurs essentiels de l'activité électrique de la cellule β .

4.4.1. Le canal K_{ATP}

Le canal K_{ATP} lie le statut métabolique au potentiel de repos et à l'activité électrique de plusieurs cellules dans l'organisme. Dans certains tissus, ce canal est également impliqué dans les voies de signalisation intervenant dans l'action d'hormones ou de neurotransmetteurs. Leur rôle physiologique a été défini en premier lieu dans la cellule β pancréatique, dans laquelle ils couplent le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline (Ashcroft *et al.* 1984, Ashcroft & Rorsman 1989).

Cette molécule clé dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est composée de deux types de sous-unités protéiques, Kir6.2 et SUR, qui s'assemblent avec une stœchiométrie de 4:4 en un complexe octamérique (*Figure 19.A et B*). Le pore du canal est constitué de quatre sous-unités Kir6.2 en général (et parfois, dans des cas plus rares, de quatre Kir6.1). L'ATP se lie à Kir6.2 pour inhiber le canal. Il y a donc quatre sites de liaison à l'ATP par canal K_{ATP} , situés aux interfaces entre les domaines cytosoliques des sous-unités Kir6.2. Cependant, la liaison d'une seule molécule d'ATP n'est pas suffisante pour clore le canal (Tucker *et al.* 1997). L'autre type de sous-unité qui compose le canal est le récepteur aux sulfonylurées SUR, qui appartient à la superfamille des cassettes de liaison à l'ATP (ATP-Binding Cassette ABC). Dans la cellule β , l'isoforme SUR1 (ABCC8) est exprimée, les isoformes SUR2 (ABCC9, A et B) étant retrouvées dans d'autres tissus. Les protéines SUR ont deux boucles cytosoliques de grande taille contenant les sites de liaison aux nucléotides NBD1 et NBD2. Ceux-ci forment deux sites séparés aux propriétés distinctes qui lient et hydrolysent le MgATP. SUR fonctionne donc comme un deuxième détecteur métabolique, en plus de Kir6.2, dotant le canal K_{ATP} d'une très grande sensibilité aux changements de concentration des adénines nucléotides. Les sulfonylurées et les protéines qui forcent l'ouverture du canal K_{ATP} agissent en se liant à la sous-unité SUR, et influencent ainsi la probabilité d'ouverture du pore formé par Kir6.2 (*Figure 19.A*).

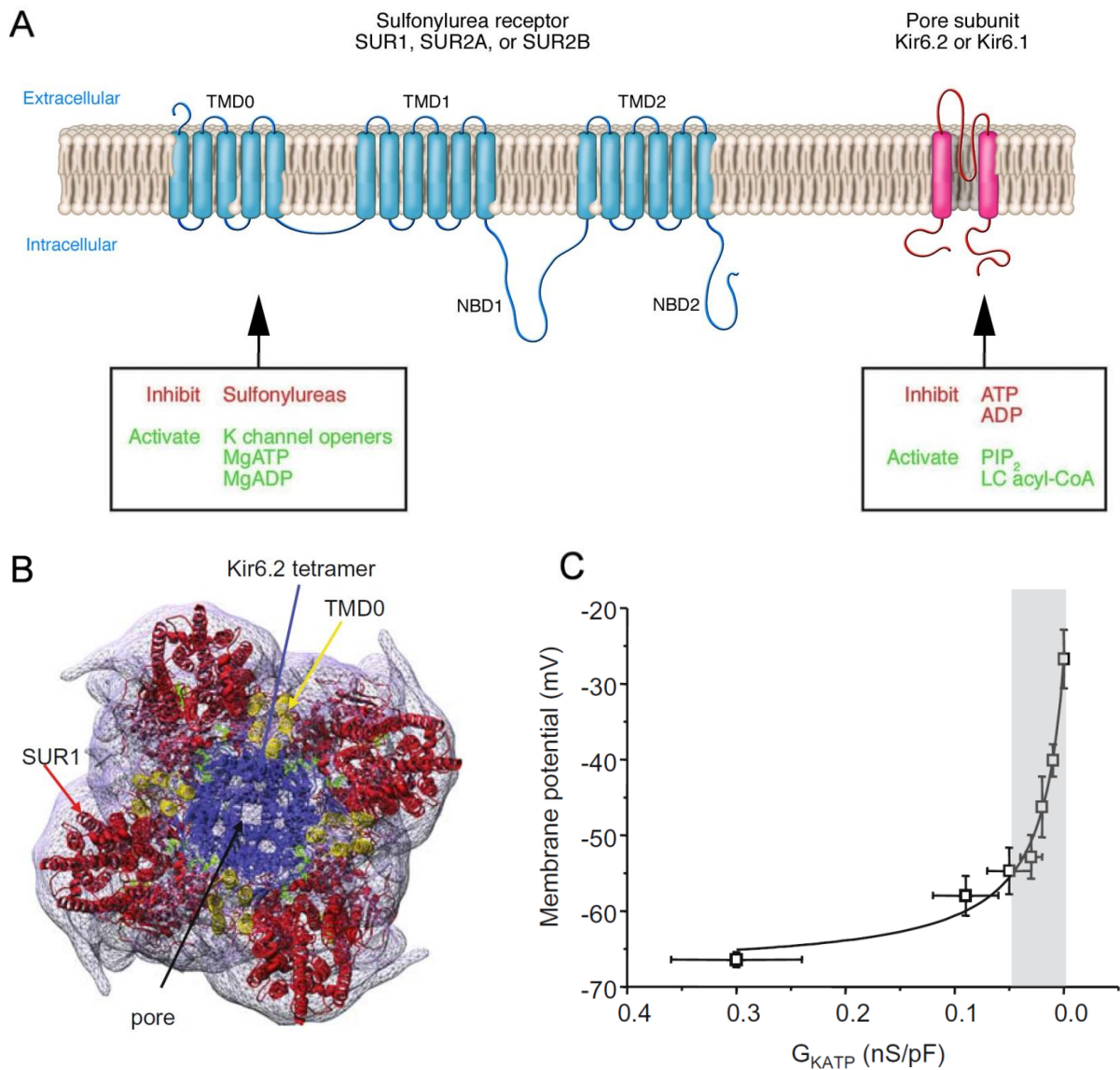


Figure 19 : Structure moléculaire du canal K_{ATP} et ses mécanismes de régulation

A: Représentation schématique de la topologie transmembranaire d'une sous-unité SURx (gauche) ou Kir6.x (droite). La liaison/hydrolyse de Mg-nucléotides sur les domaines NBD1 et NBD2 (Nucleotide-Binding Domain) de SUR stimule l'activité du canal. Les sulfonyleurées (stimulateurs) et les ouvreurs de canaux K^+ (inhibiteurs) se lient également à SUR1. La liaison d'ATP ou d'ADP à Kir6.2 ferme le pore indépendamment de Mg^{2+} . Inversement, les phospholipides tels que PIP_2 ou les LC-CoA stimulent l'activité du canal K_{ATP} et diminuent sa sensibilité à l'ATP. **B:** Vue supérieure d'un modèle de canal K_{ATP} avec les sous-unités Kir6.2 (bleu) et SUR1 (rouge et jaune). Les molécules d'ATP sont représentées en vert. **C:** Relation entre le potentiel de membrane et la conductance du canal K_{ATP} . La zone grisée montre les niveaux de conductance associés à l'activité électrique. *A d'après Ashcroft (2005), B et C d'après Proks et Ashcroft (2008).*

La régulation du canal K_{ATP} est complexe car il constitue la cible de nombreuses es-

pèces chimiques et protéiques du cytosol. Toutefois, les adénines nucléotides sont largement responsables de la transduction des effets du métabolisme glucidique. L'activité du canal est déterminée par l'équilibre entre l'inhibition par l'ATP sur Kir6.2 et l'activation de SUR1 par le ratio MgATP/MgADP. Le premier mécanisme prédomine lorsque le glucose est bas tandis que le second est favorisé quand le métabolisme glucidique est stimulé (Proks & Ashcroft 2008).

En absence de glucose, le potentiel de repos de la cellule β est déterminé presque totalement par l'activité du canal K_{ATP} . Cependant, la probabilité d'ouverture individuelle des canaux est très basse : seule 5–25% de la conductance des K_{ATP} est activée au repos (Ashcroft & Rorsman 1989). De plus, on observe une relation non linéaire entre la conductance des canaux K_{ATP} et le potentiel de membrane de la cellule β (*Figure 19.C*). Cela signifie que de petits changements de la conductance des K_{ATP} ont un effet très marqué sur l'activité électrique et la sécrétion d'insuline lorsque le potentiel de membrane est proche du seuil déclenchement du potentiel d'action.

De nombreux composés autres que l'ATP peuvent moduler la sensibilité à l'ATP des canaux K_{ATP} , comme par exemple les phosphatidylinositol phosphates (PIP_2 , PIP_3) ou encore les LC-CoA. PIP_2 et PIP_3 sont probablement impliqués dans la régulation du canal K_{APT} par les hormones (Proks & Ashcroft 2008). Un autre type de régulation implique des récepteurs couplés à des protéines G, ou encore la phosphorylation de Kir6.2 par la PKC ou la PKA (Yang *et al.* 2014).

4.4.2. Arrangement spatial et fonctionnel des canaux voltage-dépendants

Les canaux calciques voltage-dépendants sont, au même titre que le canal K_{ATP} , essentiels dans le couplage stimulus-sécrétion. En effet, l'influx calcique engendré par l'activation de ces canaux a plusieurs fonctions dans la cellule : il participe à dépolarisation membranaire au cours du potentiel d'action, régule l'expression génique et déclenche l'exocytose des granules sécrétoires. Parmi les Ca_v exprimés par la cellule β , certains sont plus importants du point de vue de la sécrétion d'insuline. Cela est par exemple le cas des $Ca_v2.1$ dans les îlots humains. L'inhibition de ces canaux en utilisant un antagoniste spécifique (*cf.* Tableau 1) im-

pacte dramatiquement la sécrétion d'insuline sans pour autant altérer de façon significative le potentiel d'action (Rorsman & Braun 2013).

Ces canaux sont fonctionnellement couplés à la machinerie d'exocytose, ce qui permet une augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$ maximale à proximité des vésicules sécrétoires pour rapidement initier l'exocytose (Bokvist *et al.* 1995). D'autre part, l'excitosome formé par le couplage des Ca_v avec les protéines du complexe SNARE est essentiel pour l'exocytose induite par la dépolarisation membranaire (Wiser *et al.* 1999). Cet arrangement spatial et fonctionnel est probablement responsable du fait que peu de canaux Ca_v ont besoin d'être activés pour déclencher une réponse exocytotique rapide (Barg *et al.* 2001). Les canaux $K_v2.1$ ont également été montrés comme étant couplés à une protéine de la machinerie d'exocytose, la syntaxine 1A. Cette interaction physique est essentielle à la sécrétion d'insuline dans les cellules β humaines (Dai *et al.* 2012).

Hormis les canaux Ca_v de type L et P/Q, la cellule β exprime d'autres types de canaux calciques voltage-dépendants qui interviennent à différentes étapes du potentiel d'action. De plus, certaines études montrent que les mêmes canaux ne seraient pas impliqués dans la première et la seconde phase de la sécrétion biphasique d'insuline. Ainsi, tandis que les $Ca_v1.2$ (type L) sont particulièrement importants chez la souris pour la première phase de la sécrétion d'insuline, les canaux $Ca_v2.3$ (type R) seraient impliqués dans la seconde phase de sécrétion, probablement en induisant une augmentation globale de la $[Ca^{2+}]_i$ afin de mobiliser de nouvelles granules sécrétoires (Renstrom & Rorsman 2008, Rorsman *et al.* 2011).

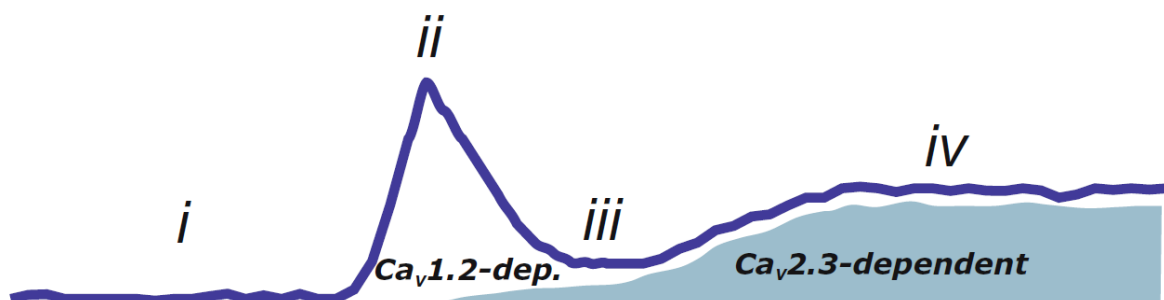


Figure 20 : Activité des canaux Ca^{2+} pendant la sécrétion biphasique de l'insuline

Les canaux calciques $Ca_v1.2$ sont particulièrement importants pour la phase précoce de la libération d'insuline, alors que les canaux $Ca_v2.3$ contrôlent la seconde phase en accélérant la mobilisation de nouvelles vésicules. **i**: Phase pré-stimulatoire ; **ii**: 1^{ère} phase de la sécrétion d'insuline ; **iii**: Phase de nadir ; **iv**: 2^{nde} phase de la sécrétion d'insuline. D'après Renstrom et Rorsman (2008).

Comme le K_{ATP} , les Ca_v sont la cible de plusieurs régulations intracellulaires. Parmi ces régulations, on peut citer les protéines kinases PKC et PKA activées lors d'une augmentation de la $[AMPc]_i$ (suite à une stimulation hormonale par le GLP-1 par exemple), et qui augmentent l'activité des Ca_v . Les Ca_v sont également régulés par des récepteurs couplés aux protéines G (impliqués dans l'action des hormones telles que l'adrénaline), ainsi que par des facteurs de couplage issus du métabolisme glucidique (Yang *et al.* 2014).

5. LES MÉCANISMES DE RÉGULATION AU SEIN DE L'ÎLOT

Afin de répondre aux modifications de l'état métabolique de l'organisme et des conditions environnementales, les cellules β doivent produire une réponse réactive : l'initiation et l'arrêt de la sécrétion d'insuline doivent donc être rapides, et la libération d'insuline précisément régulée en termes de quantité. Cette réactivité est atteinte par le fonctionnement coordonné de multiples cellules β , non seulement à l'échelle de l'îlot de Langerhans, mais également entre les îlots dispersés au sein du pancréas.

Ainsi, des mécanismes de synchronisation sont nécessaires pour pouvoir atteindre cette coordination. Les cellules β sont donc régulées de façon hormonale et nerveuse afin d'intégrer l'état de l'organisme entier. Ces régulations que l'on peut qualifier d' « externes » aux îlots régulent la sécrétion d'insuline en modulant l'activité des cellules β en réponse au glucose. De plus, ils permettent de synchroniser l'activité des multiples îlots qui sont éparpillés au sein du parenchyme exocrine du pancréas et qui ne disposent donc pas de mécanismes de communication directe entre eux (Malaisse & Malaisse-Lagae 1984, Prentki & Matschinsky 1987).

En plus de ces régulations extérieures aux îlots, de nombreux mécanismes de régulation existent à l'intérieur des îlots, qui sont capables de répondre efficacement aux variations du glucose même lorsqu'ils sont extraits de l'organisme. Les cellules β au sein de chaque îlot sont en effet capables de se synchroniser entre-elles sans l'intervention de régulations externes à l'îlot, comme le montrent la présence d'oscillations de l'activité dans les îlots isolés (*cf.* chapitre 7).

Ainsi, chaque cellule β émet un certain nombre de facteurs qui agissent sur les cellules β voisines ainsi que sur les autres types cellulaires présents, qui eux-mêmes régulent les cellules β par la sécrétion de molécules dans l'espace intercellulaire. Les deux types cellulaires des îlots les plus impliqués, avec les cellules β , dans ces régulations intra-îlots sont les cellules α glucagon-sécrétrices, et les cellules δ qui produisent et libèrent la somatostatine.

5.1. Les autres cellules endocrines de l'îlot

5.1.1. La cellule α

Tout comme la cellule β , la cellule α pancréatique est un détecteur du glucose impliqué dans le maintien de la glycémie, puisqu'elle produit et sécrète le glucagon, une hormone hypoglycémisante dont les effets sont opposés à ceux de l'insuline.

Le glucagon est, tout comme l'insuline, synthétisé sous une première forme immature nommée proglucagon, qui subit des modifications post-traductionnelles pour aboutir au glucagon mature. Le clivage du proglucagon dans la cellule α est opéré par la prohormone-convertase 2 (Whalley *et al.* 2011). Le proglucagon est également synthétisé dans d'autres organes, principalement l'intestin (dont les cellules endocrines du pancréas sont issues du point de vue phylogénétique) et le cerveau. Dans ces organes, le proglucagon est clivé en d'autres peptides, les plus connus étant les incrétines GLP-1 et GLP-2 produites par les cellules L intestinales (Figure 21).

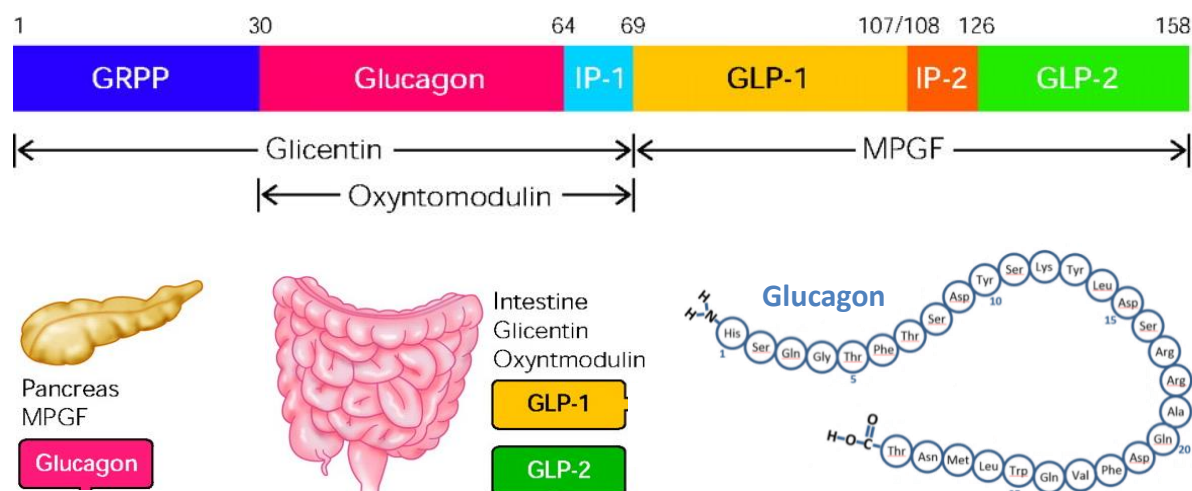


Figure 21 : Organisation structurelle du proglucagon et des peptides dérivés

Les peptides libérés spécifiquement dans le pancréas ou l'intestin sont indiqués sous la séquence complète du proglucagon. Les numéros au-dessus de la structure du proglucagon indiquent les positions relatives des acides-aminés des différents peptides qui en dérivent. GLP, glucagon-like peptide; GRPP, glicentin-related pancreatic peptide; MPGF, major proglucagon-derived fragment; IP, intervening peptide. D'après Sinclair et Drucker (2005). Tout à droite est donnée la structure primaire du glucagon. D'après <http://www.diapedia.org/metabolism/glucagon>.

Bien que la déficience en insuline résultant d'un déficit fonctionnel des cellules β ait longtemps été considérée comme centrale dans la pathophysiologie du diabète, il est maintenant admis qu'un excès de glucagon, causé par l'absence de sécrétion d'insuline, caractérise également cette maladie et est responsable de multiples manifestations du diabète en contribuant à aggraver l'hyperglycémie (Unger & Orci 1975, Quesada *et al.* 2008, Unger & Cherrington 2012, Godoy-Matos 2014). En effet, comme nous le verrons par la suite, la cellule β exerce une inhibition sur l'activité de la cellule α à haut glucose. La dysfonction voire la destruction des cellules β au cours du diabète lève ce contrôle négatif de l'activité des cellules α dont la sécrétion devient alors excessive. Cette importance de l'augmentation de la sécrétion du glucagon dans le diabète montre que la cellule α est également cruciale dans le maintien de l'homéostasie, et sa sécrétion doit être, tout comme celle de l'insuline, exactement régulée.

Nous avons au cours du précédent chapitre vu que les mécanismes par lesquels une augmentation de la glycémie régule la sécrétion d'insuline par la cellule β sont bien connus. En revanche il n'existe aucun consensus concernant les mécanismes de régulation de la sécrétion de glucagon par le glucose. Les hypothèses actuelles se répartissent en trois catégories.

En premier lieu, il est possible que la concentration de glucose soit mesurée par des détecteurs de glucose extra-pancréatiques qui renvoient l'information aux cellules α par voie nerveuse (Miki *et al.* 2001, Thorens 2011). Cependant, la sécrétion de glucagon est aussi régulée indépendamment du contrôle nerveux comme attesté par les études sur îlots isolés. La deuxième proposition est donc que la détection du glucose doit se faire à l'intérieur même de l'îlot par les cellules β et δ qui contrôlent les cellules α par la libération paracrine d'insuline inhibitrice (Ostenson 1979), de zinc (Ishihara *et al.* 2003), de GABA (Rorsman *et al.* 1989) ou de somatostatine (Starke *et al.* 1987). Enfin, des études supportent l'hypothèse de l'existence d'une détection de glucose par la cellule α elle-même. Dans cette dernière catégorie, plusieurs mécanismes ont été proposés. La diminution de glucose causerait une dépolarisation induisant un influx calcique qui initie la sécrétion de glucagon. Cette dépolarisation pourrait être causée soit par une diminution de l'activité de la pompe électrogène Na^+/K^+ (car moins d'ATP) (Bode *et al.* 1999), soit par l'activation d'un influx calcique dépolarisant depuis les stocks intracellulaires contenus dans le réticulum endoplasmique par la SERCA (Liu *et al.* 2004, Vieira *et al.* 2007).

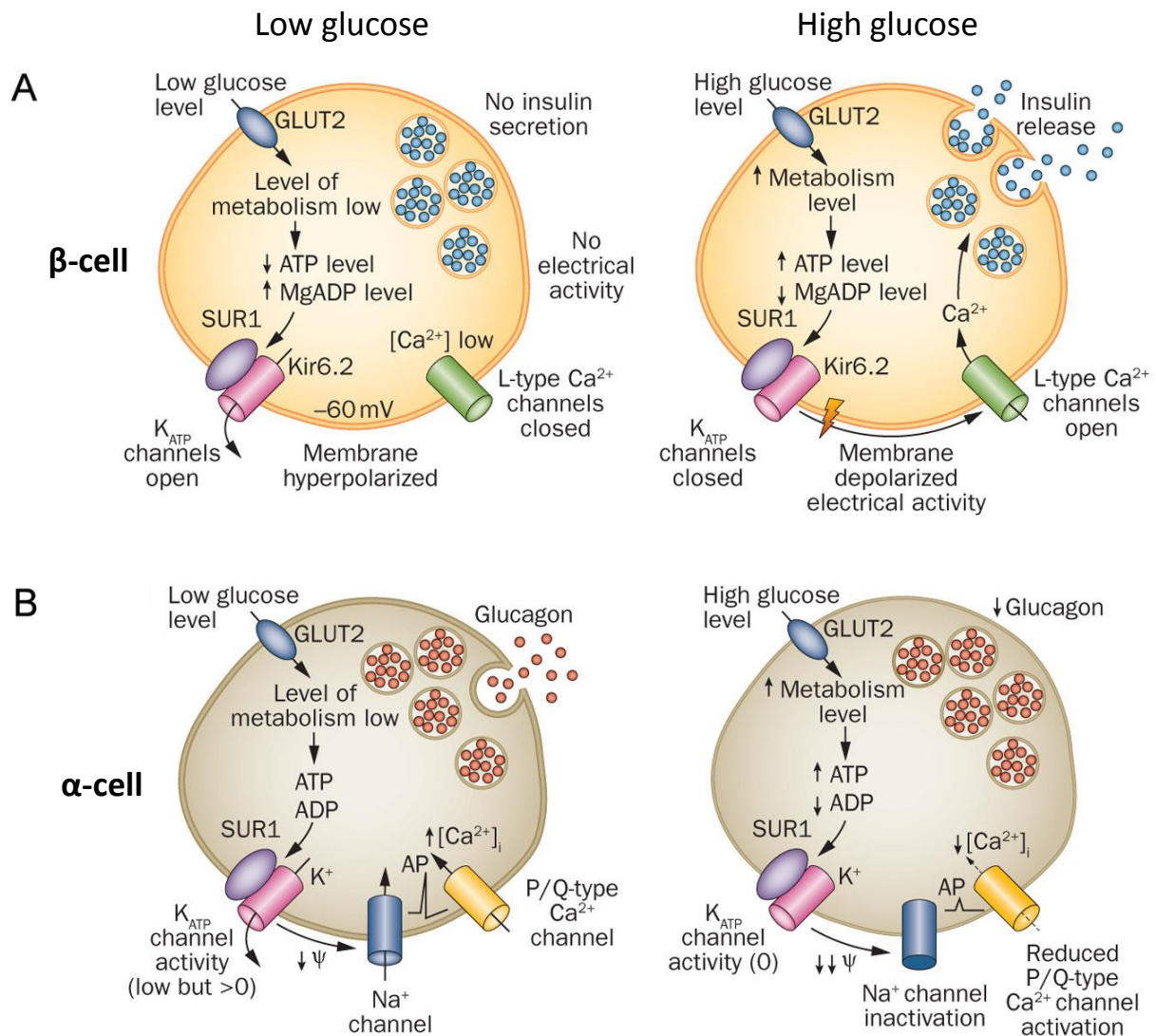


Figure 22 : Comparaison du couplage entre glucose et sécrétion dans les cellules β et α

A: La sécrétion d'insuline par les cellules β est inhibée à bas glucose (gauche) et activée à haut glucose (droite) selon des mécanismes bien caractérisés. **B:** Aucun consensus n'a été établi concernant les mécanismes grâce auxquels la cellule α détecte le glucose. Le modèle privilégié propose que l'activité électrique (faible dépolarisation de la membrane) de la cellule α est associée avec l'activation des canaux Na_v et Ca_v , l'influx calcique par les Ca_v déclenchant la sécrétion de glucagon à bas glucose (gauche). L'augmentation des taux de glucose augmente à 6 mM (droite) ferme totalement les canaux K_{ATP} , dépolarisant encore plus la membrane. L'inactivation des Na_v au potentiel atteint se traduit par une amplitude réduite des potentiels d'action (AP), ce qui entraîne une moindre activation des Ca_v de type P/Q liés à l'exocytose et donc une réduction de la sécrétion de glucagon. D'après Ashcroft et Rorsman (2013).

Contrairement aux cellules β , les cellules α sont électriquement actives en absence de glucose et génèrent de très grands potentiels d'action. Les cellules α sont équipées de canaux K_{ATP} composés des mêmes sous-unités que dans les cellules β . Le rôle de ces canaux dans la

cellule α est demeuré une énigme. Dans la plupart des modèles, il a été proposé que l'activité du canal K_{ATP} dans la cellule α est régulée de la même façon que dans la cellule β . L'augmentation du ratio ATP/ADP à haut glucose fermerait le canal K_{ATP} , résultant en une dépolarisation de la membrane, qui inhiberait alors le déclenchement de potentiels d'action dans la cellule α . En revanche, à bas glucose, l'activation des K_{ATP} hyperpolariserait la cellule α , ce qui supprimerait l'inhibition induite par la dépolarisation (présente à haut glucose) des canaux ioniques impliqués dans le déclenchement du potentiel d'action, provoquant ainsi la sécrétion de glucagon (Rorsman *et al.* 2008). Ce dernier modèle est actuellement le plus répandu (Rorsman *et al.* 2012, Gylfe 2013, Gylfe & Gilon 2014).

5.1.2. La cellule δ

La cellule δ sécrète la somatostatine en réponse au glucose. Sa physiologie demeure peu connue mais certains résultats ont apporté quelques indications sur les mécanismes impliqués dans la sécrétion de la somatostatine.

Comme les cellules β et α , les cellules δ sont équipées de canaux K_{ATP} et leur membrane se dépolarise lors d'une augmentation des taux de glucose. Les cellules δ sont stimulées à des concentrations de glucose inférieures à celles nécessaires au déclenchement d'une réponse dans la cellule β (~3 mM), probablement parce qu'elles expriment moins de canaux K_{ATP} . Les mécanismes du couplage stimulus-sécrétion observés dans la cellule β ne semblent pas être valables pour la sécrétion de somatostatine. En effet, il est plutôt suggéré que la fermeture des canaux K_{ATP} dépolarise la cellule δ lors d'une augmentation de la concentration de glucose, et que la sécrétion de somatostatine dépendrait non pas des Ca_v de type L comme c'est le cas dans la cellule β , mais plutôt de la libération de Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires (réticulum endoplasmique) induite par l'influx de Ca^{2+} au travers des Ca_v de type R. Cependant, la nature exacte du couplage stimulus-sécrétion dans la cellule δ demeure hypothétique en raison du peu d'études électrophysiologiques conduites sur ce type cellulaire (Drews *et al.* 2010).

5.2. Régulations autocrines et paracrines des cellules β et α

Les différents types cellulaires présents dans l'îlot interagissent entre eux en émettant de multiples facteurs chimiques qui modulent l'activité des cellules voisines. L'importance de ces régulations est variable entre les espèces, cela en raison des différences existant dans l'anatomie des îlots des différentes espèces étudiées. En effet, dans les îlots humains, une cellule β est presque toujours en contact avec une cellule α et une cellule δ (Cabrera *et al.* 2006, Bosco *et al.* 2010), et les interactions paracrines y jouent donc probablement un rôle assez important. Dans les îlots de souris au contraire, les cellules β , en majorité, ne contactent pas de cellule α , qui seraient plutôt régulées par le système nerveux autonome étant donné la plus riche vascularisation des îlots chez la souris que chez l'Homme (Caicedo 2013).

Tous les types cellulaires présents au sein de l'îlot communiquent potentiellement entre eux par des mécanismes de régulation paracrine. Cependant, les régulations les mieux caractérisées sont les régulations entre les cellules β et α , ainsi que les mécanismes de régulation autocrine propres à ces cellules, qui sont récapitulés dans la *Figure 23*.

5.2.1. Les facteurs émis par la cellule β

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, la cellule β sécrète en même temps que l'insuline plusieurs autres facteurs parmi lesquels le zinc, l'ATP, le NPY ou encore le GABA. Toutes ces molécules libérées dans l'espace intracellulaires sont susceptibles d'agir comme des signaux sur les autres cellules environnantes. Plusieurs données indiquent qu'une signalisation autocrine, c'est-à-dire des cellules β sur les cellules β , est impliqué dans la fonction de ces cellules. En effet, l'insuline par exemple joue probablement un rôle important pour le maintien de la masse et de la fonction des cellules β en agissant au niveau transcriptionnel (Leibiger *et al.* 2008). Des effets plus aigus de l'insuline et d'autres transmetteurs entre également en jeu dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Cependant les effets des différents transmetteurs ne sont pas totalement clairs. Ainsi, l'insuline exogène a été montrée comme ayant des effets stimulateurs, inhibiteurs ou mixtes sur la $[Ca^{2+}]_i$ ou la sécrétion de la cellule β , dépendant de la dose utilisée (Braun *et al.* 2012). Le NPY produit et libéré par la cellule β , semble avoir un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Wang *et al.* 1994), cependant des études suggèrent que ce neuropeptide est exprimé dans les cellules β uniquement pendant le développement embryonnaire (Whim 2011). Le zinc, important pour

le stockage de l'insuline dans les vésicules de sécrétion, est libéré par la cellule β lors de la sécrétion d'insuline. Il agirait de façon autocrine sur la cellule β en augmentant la sécrétion d'insuline, mais les mécanismes impliqués n'ont pas encore été élucidés. L'ATP libéré par la cellule β joue très certainement un rôle dans la sécrétion d'insuline, mais les résultats obtenus chez le rongeur sont contradictoires, des effets inhibiteurs et stimulateurs ayant été recensés. Dans les îlots humains, la signification physiologique des récepteurs à l'ATP est encore plus incertaine et mérite de plus amples investigations. Toutefois, une récente étude a montré que l'ATP agit comme un signal autocrine positif dans les cellules β humaines en activant des récepteurs purinergiques P2Y1 à la surface de la cellule β , en stimulant l'activité électrique ainsi qu'en couplant l'influx calcique à la libération de Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires du réticulum endoplasmique (Khan *et al.* 2014). Le GABA est présent en grande quantité dans les cellules β (Franklin & Wollheim 2004). Il est libéré par les cellules β et exerce des effets autocrines différents selon le récepteur considéré : ainsi l'activation du récepteur GABA_B semble inhiber la sécrétion d'insuline (Dong *et al.* 2006), tandis que l'activation du récepteur GABA_A tend à dépolariser la membrane et augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans des cellules clonales d'insulinome (Bonaventura *et al.* 2008, Braun *et al.* 2010), et semble jouer un rôle important dans la sécrétion d'insuline et la survie cellulaire dans les cellules β humaines (Soltani *et al.* 2011).

En général, l'effet autocrine reporté pour ces substances est assez variable, et pourrait refléter des différences inter-espèces ou encore les conditions expérimentales variables d'une étude à l'autre. De plus, tous ces effets ont été évalués en appliquant des substances de façon exogène durant les expériences, et les concentrations extracellulaires natives de ces produits sécrétoires dans l'espace intercellulaire ne sont pas connues. En se basant sur la concentration intravésiculaire de ces différentes substances, et en estimant ainsi la quantité de chaque composé sécrétée en réponse au glucose par rapport au volume des espaces intercellulaires, on peut supposer que ces transmetteurs sont libérés en quantité suffisante pour pouvoir agir de façon autocrine lors d'une stimulation au glucose (Braun *et al.* 2012). Cependant, la signalisation autocrine est probablement un processus complexe faisant intervenir une large variété de transmetteurs et de voies de signalisation. L'importance du processus autocrine global dans la sécrétion d'insuline est donc difficile à établir, mais ces mécanismes agissent vraisemblablement pour potentialiser/amplifier la réponse sécrétoire au glucose (comme par exemple avec

le GABA), ou encore pour synchroniser les cellules β voisines pour augmenter l'efficacité de la sécrétion d'insuline (ce qui pourrait faire intervenir l'ATP) (Braun *et al.* 2012).

Les divers facteurs libérés par la cellule β en réponse au glucose n'agissent pas seulement sur les cellules β voisines, mais également sur les autres types cellulaires situés dans leur voisinage direct. Ainsi, l'activité de la cellule α est régulée par ces molécules, et ces régulations pourraient avoir une place de poids dans les mécanismes par lesquels la cellule α détecte les niveaux de glucose ambiant, étant donné que ceux-ci n'ont pas encore été bien définis. L'activité de la cellule α est inhibée par les produits de sécrétion de la cellule β (Gromada *et al.* 2007, Quesada *et al.* 2008, Hardy *et al.* 2011, Caicedo 2013).

L'un des plus importants mécanismes paracrine responsable de l'inhibition de la sécrétion de glucagon est l'insuline qui agit par plusieurs voies de signalisation, entre autre en augmentant l'activité du canal K_{ATP} dans la cellule α , induisant une hyperpolarisation membranaire responsable de l'arrêt de la libération de glucagon (Franklin *et al.* 2005). L'insuline favorise également la translocation de récepteurs $GABA_A$ à la membrane plasmique des cellules α (Xu *et al.* 2006), favorisant ainsi l'effet du GABA sur ces cellules, qui a lui aussi été montré comme étant inhibiteur de la sécrétion de glucagon (Franklin & Wollheim 2004). L'insuline inhibe également le signal calcique de la cellule α , nécessaire à la sécrétion de glucagon (Ravier & Rutter 2005). Le zinc étant co-sécrété avec l'insuline par la cellule β , il a été proposé qu'il était lui aussi capable de moduler la sécrétion de glucagon. Cependant, son rôle reste controversé. En effet, il a été montré que le zinc active les canaux K_{ATP} et diminue la sécrétion de glucagon dans les cellules α isolées (Ishihara *et al.* 2003, Franklin *et al.* 2005). D'autre part, ces résultats contrastent avec l'absence d'effets du zinc sur les cellules α de souris rapportée par une autre étude (Ravier & Rutter 2005).

5.2.2. Les facteurs émis par la cellule α

Réciproquement, les produits sécrétoires de la cellule α ont été démontrés comme ayant un effet sur la sécrétion d'insuline et pourraient donc intervenir dans des mécanismes de régulation paracrine sur la cellule β . En effet, des expériences *in vitro* ont montré que le glucagon stimule la sécrétion d'insuline dans les pancréas perfusés de rats (Stagner *et al.* 1989) ou humains (Brunicardi *et al.* 2001). En outre, le glucagon interviendrait également dans une régulation autocrine de la cellule α . En effet, une application de glucagon induit une augmen-

tation dose-dépendante de la capacitance membranaire de la cellule α chez le rat, représentative d'une augmentation du nombre de vésicules libérées par exocytose. Le récepteur du glucagon a été détecté dans les cellules α purifiées et les îlots de rat. Il a été montré que le glucagon se lie spécifiquement à son récepteur sur la cellule α (et pas sur les récepteurs au GLP-1), dans laquelle il déclencherait des voies de signalisation de l'AMPC et de la PKA (Ma *et al.* 2005). Cependant, il n'est pas clair si le récepteur du glucagon est exprimé dans les cellules α humaines.

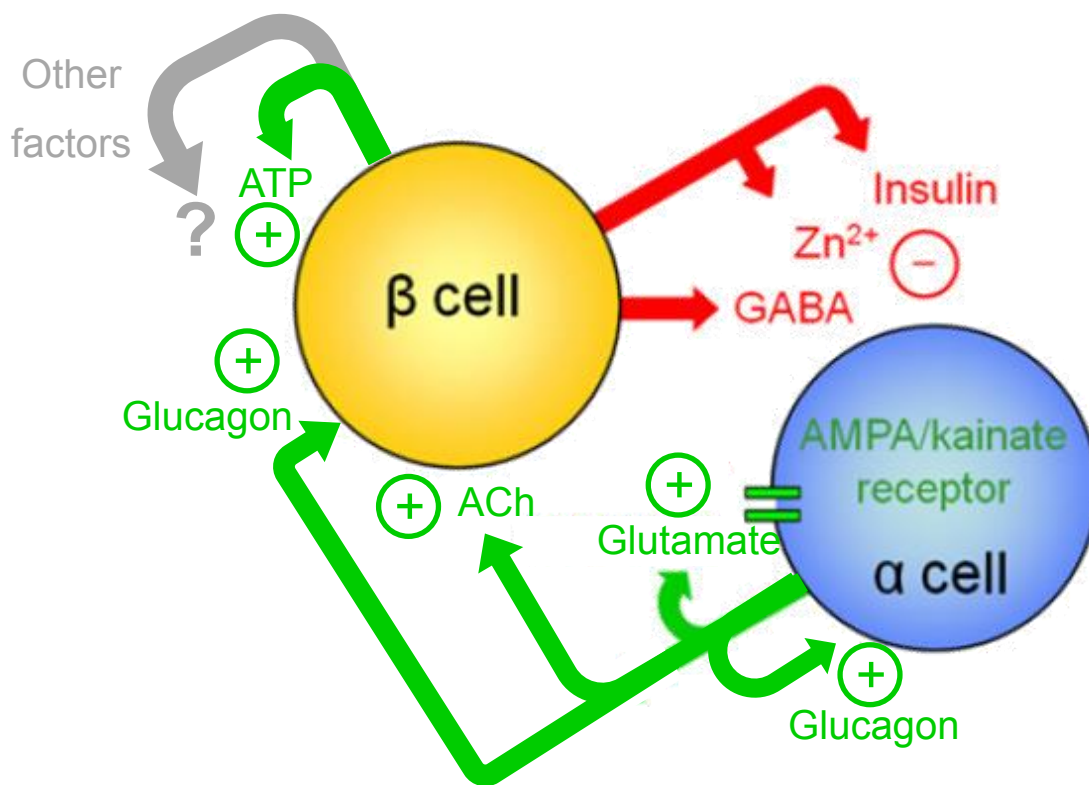


Figure 23 : Les régulations paracrines et autocrines des cellules α et β pancréatiques

La cellule β sécrète de multiples facteurs qui inhibent la sécrétion de glucagon par la cellule α . L'ATP sécrété par la cellule β stimule la sécrétion d'insuline. En revanche, les données concernant les effets autocrines des autres facteurs sécrétés par la cellule β sont contradictoires. Le glucagon sécrété par la cellule α stimule la sécrétion d'insuline et de glucagon. La cellule α sécrète également du glutamate qui agit comme un signal autocrine pour augmenter l'activité sécrétoire de la cellule α . Dans les îlots humains, l'acétylcholine (ACh) est sécrétée par la cellule α et agit comme un signal paracrine non neuronal pour stimuler la sécrétion d'insuline. D'après Cabrera *et al.* (2008), Rodriguez-Diaz *et al.* (2011b), Caicedo (2013), Khan *et al.* (2014) et Braun *et al.* (2012).

La cellule α produit et sécrète également du glutamate. Il a été suggéré que les trois types cellulaires majoritaires (β , α et δ) des îlots possèdent la capacité de générer, stocker et libérer du glutamate et qu'elles sont capables de répondre au glutamate dans une certaine mesure (Moriyama & Hayashi 2003, Gromada *et al.* 2007). La cellule α synthétise du glutamate grâce à la glutaminase activée par le phosphate (Inagaki *et al.* 1995) et capte également du glutamate plasmatique par des transporteurs de glutamate dépendants du sodium (Weaver *et al.* 1998). Le glutamate est transféré dans les vésicules contenant le glucagon par les transporteurs de glutamate de type 1 et 2 (VGLUT1 et VGLUT2), et est sécrété en quantités stœchiométriques avec le glucagon à bas glucose (Hayashi *et al.* 2003b). Il a été démontré que l'application de glutamate sur les cellules β clonales ou les cellules β d'îlots de rat déclenche la libération de GABA, suggérant un rétrocontrôle négatif indirect du glutamate sur la sécrétion de glucagon (Hayashi *et al.* 2001, Hayashi *et al.* 2003a, Hayashi *et al.* 2003b). D'autre part, le glutamate pourrait agir sur les récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluR) exprimés par les cellules α (Tong *et al.* 2002). Cependant, ces données sont en désaccord avec de plus récentes études qui suggèrent que le glutamate est un régulateur positif de la sécrétion de la cellule α en se fixant à un récepteur glutamatergique ionotrope (iGluR) excitateur du type AMPA exprimé chez le rat (Bertrand *et al.* 1993). Une autre étude a démontré que le glutamate libéré par les cellules α se lie à des iGluRs de type AMPA/Kaïnate, qui de plus ne sont pas exprimées dans les cellules β , pour induire un signal électrique excitateur dans la cellule α (Cabrera *et al.* 2008). Cette étude montre également que cet effet n'implique pas les mGluRs.

Enfin, une étude récente a démontré que la cellule α humaine sécrète de l'acétylcholine en réponse à une diminution de la concentration de glucose ou à une stimulation par le Kaïnate, pour stimuler localement la sécrétion d'insuline par la cellule β . L'étude suggère que l'acétylcholine dans les îlots humains agirait préférentiellement par ce mécanisme paracrine (Rodriguez-Diaz *et al.* 2011b). En effet, tandis que la signalisation par les récepteurs cholinergiques muscariniques est essentielle à la régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline dans les îlots de souris, chez l'Homme il a été montré que l'innervation cholinergique des îlots est beaucoup plus rare que chez les autres espèces. La signalisation par l'acétylcholine dans les îlots humains ne transmettrait donc pas une information depuis les centres nerveux centraux du système autonome, mais plutôt un message local pour optimiser la sécrétion des hormones et garder la cellule β réactive lors d'une diminution du glucose en

préparation d'une augmentation ultérieure de la glycémie (Caicedo 2013, Rodriguez-Diaz *et al.* 2014).

5.2.3. Quelle est la situation *in vivo* ?

Même si les cellules des îlots sont influencées par les différents produits sécrétoires des cellules β et α , les effets jusqu'à présent recensés n'ont été observés qu'*in vitro*. Il n'est donc pas certains que ceux-ci existent toujours dans le contexte de l'organisme entier, où les régulations externes aux îlots pourraient prendre le pas sur ces mécanismes locaux.

De plus, les quantités réellement sécrétées de ces facteurs au sein des îlots sont inconnues, et ceux-ci pourraient ne pas être libérés en quantité suffisante pour agir localement sur les cellules voisines, étant donné les mécanismes de dégradation de ces facteurs qui existent au niveau extracellulaire.

En outre, les îlots dans le contexte de l'animal entier sont richement vascularisés, et ces différents facteurs, plutôt que d'agir directement sur les cellules voisines, pourraient également être impliqués dans des mécanismes de régulation du flux sanguin par vasoconstriction/vasodilatation des capillaires dans l'îlot.

Ainsi, même si de potentielles régulations intercellulaires par diffusion de facteurs au sein de l'îlot peuvent se produire, leur existence réelle *in vivo* reste à démontrer.

6. LE COUPLAGE CELLULAIRE PAR LES JONCTIONS COMMUNICANTES

La modulation continue de la sécrétion d'insuline nécessite l'initiation et l'arrêt coordonné de l'activité de milliers de cellules β . Nous venons de voir que des mécanismes existent pour coordonner les cellules β au sein de l'îlot. Ceux-ci impliquent les potentiels signaux paracrines et autocrines abordés lors du précédent chapitre, ainsi que des voies de signalisation médiées par des protéines membranaires, qui sont regroupées à des sites localisés de contacts focaux entre deux cellules β . Parmi ces interactions membranaires intercellulaires, les jonctions communicantes jouent un rôle crucial en permettant un couplage métabolique et électrique entre les cellules β de l'îlot, et de plus en plus de données montre un rôle important pour les connexines, les protéines membranaires qui forment les canaux des jonctions communicantes, dans la fonction même de la cellule β (Bosco *et al.* 2011, Potolicchio *et al.* 2012). Nous allons maintenant voir quel est le rôle général des jonctions communicantes ainsi que leur structure et les principaux mécanismes impliqués dans leur régulation avant de décrire leur rôle dans la fonction des îlots.

6.1. Fonctions et structure

La plupart des organismes multicellulaires ont établi des mécanismes de communication intercellulaire basés sur les jonctions communicantes. Celles-ci sont des regroupements de canaux intercellulaires qui autorisent la diffusion d'ions mais également de molécules plus grandes telles que des métabolites, des nucléotides, des cofacteurs vitaminés, de petits peptides et des fragments d'acides nucléiques entre les cytosols des deux cellules connectées. Les échanges de cellule à cellule de ces molécules par les canaux jonctionnels sont respectivement appelés couplage électrique (ions) et couplage métabolique (autres molécules). Les jonctions communicantes jouent un rôle important dans le développement prénatal, la morphogénèse et la différenciation de nombreux tissus, ainsi que dans de nombreuses fonctions dans les systèmes adultes différenciés (Bosco *et al.* 2011).

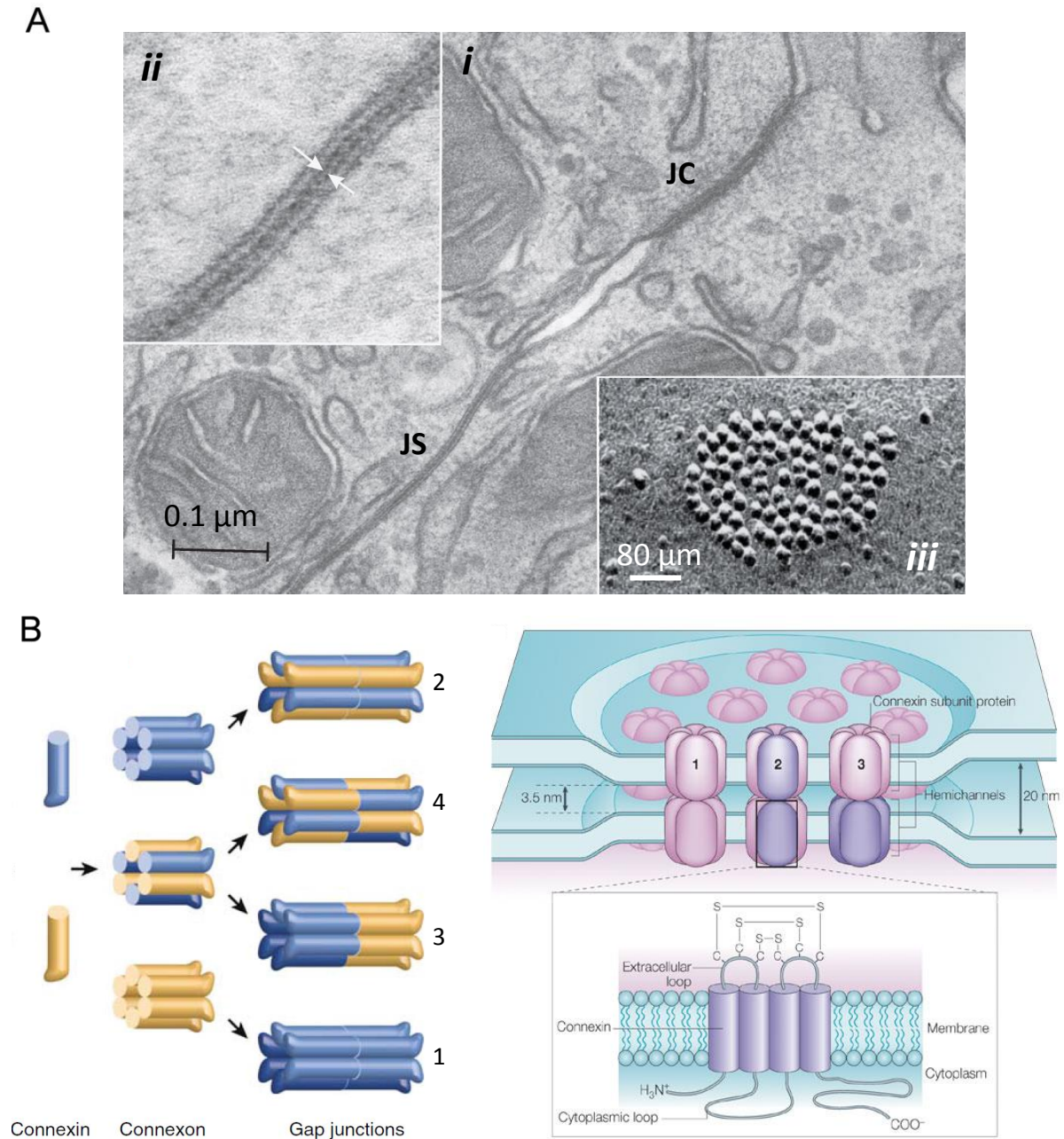


Figure 24 : Morphologie et structure des jonctions communicantes

A: Cliché de microscopie électronique de jonctions communicantes joignant des hépatocytes voisins chez la souris. **i:** La jonction communicante (JC) est observable par l'apposition des membranes cellulaires, clairement distincte de la jonction serrée (JS). **ii:** Vue en grossissement de la jonction communicante révélant l'écart de 2-3 nm (flèches) séparant les membranes plasmiques. **iii:** L'immunomarquage à l'or d'ultracyrosections permet d'observer la surface cytoplasmique des plaques jonctionnelles. D'après Goodenough et Paul (2009), Klee et al. (2008). **B:** L'unité de base du canal jonctionnel est la connexine. Six connexines s'assemblent pour former un connexon ou héli-canal homomérique ou hétéromérique. La juxtaposition de deux héli-canaux situés dans les membranes de deux cellules voisines forme un canal jonctionnel homotypique homomérique (1), homotypique hétéromérique (2), hétérotypique homomérique (3) ou hétérotypique hétéromérique (4). Une jonction communicante est un accolement des membranes plasmiques de deux cellules voisines, au niveau duquel se retrouvent de multiples canaux jonctionnels. D'après Mese et al. (2007) et Sohl et al. (2005).

On peut citer par exemple la division et la migration cellulaire, la transmission hormonale, la synchronisation électrique et métabolique entre cellules, la sécrétion, la résistance à des agents cytotoxiques, la compensation de déficits enzymatiques et la transmission de facteurs trophiques ou apoptotiques (Laird 2010, Bosco *et al.* 2011, Potolicchio *et al.* 2012).

Les jonctions communicantes fournissent l'une des formes de communication intercellulaire les plus communes et remplissent des fonctions similaires dans tous les animaux multicellulaires (métazoaires). Leur structure est donc également presque identique chez tous les animaux. Elles sont composées de protéines membranaires qui sont regroupées dans des micro-domaines de la membrane formant les plaques jonctionnelles, au niveau desquelles les membranes de deux cellules voisines sont séparées par un espace intercellulaire de 2–3 nm seulement (cet espace « gap » donne son nom anglais aux jonctions communicantes : les « gap junctions », appelée parfois aussi en français jonctions gap). Ces protéines membranaires, appelées connexines, sont regroupées au niveau de la membrane de chaque cellule sous forme d'hexamères appelés connexons ou héli-canaux. Les connexons aux membranes de deux cellules voisines s'associent au niveau des jonctions communicantes pour former un canal jonctionnel (*Figure 24*) (Klee *et al.* 2008, Bosco *et al.* 2011, Cigliola *et al.* 2012, Farnsworth & Benninger 2014).

Dans le génome humain, 22 connexines différentes ont été identifiées, contre 19 chez la souris (Eiberger *et al.* 2001, Willecke *et al.* 2002) (*Tableau 2*). Les différentes isoformes sont identifiées par leur poids moléculaire. Par exemple, la connexine 36 fait 36 kDa (Sohl & Willecke 2003). La pertinence de la fonction des connexines *in vivo* est supportée par les phénotypes spécifiques observés chez les souris transgéniques chez lesquelles des connexines sélectionnées ont été supprimées, surexprimées ou bien mutées. Cela est encore renforcé par l'existence de plusieurs maladies humaines qui sont associées à des mutations d'une connexine ou à des SNP. Cela suggère que chaque connexine remplit un rôle bien spécifique et ne peut pas être efficacement remplacée par d'autres isoformes. Une raison possible pour cela réside dans les propriétés de perméabilité, de conductance et des différents mécanismes régulant l'ouverture du canal, qui semblent être propres à chaque isoforme (Laird 2006, Scemes *et al.* 2009, Laird 2010, Bosco *et al.* 2011, Potolicchio *et al.* 2012).

Tableau 2 : Les différentes connexines retrouvées chez l'Homme et la souris

Human				Mouse			
Cx	Gene	ID no.	Chromosome	Chromosome	ID no.	Gene	Cx
hCx23			6	10			mCx23
hCx25	GJB7	[375519]	6q15				
hCx26	GJB2	[2706]	13q11-q12	14d1-e1	[14619]	Gjb2	mCx26
hCx29	GJE1	[349149]	7q22.1	5g2	[118446]	Gje1	mCx29
hCx30	GJB6	[10804]	1 13q11-12.1	14c2	[14623]	Gjb6	mCx30
hCx31.9	GJA11	[125111]	17q21.2	11d	[353155]	Gja11	mCx30.2
hCx30.3	GJB4	[127534]	1p34.3	4d1-d3	[14621]	Gjb4	mCx30.3
hCx31	GJB3	[2707]	1p34	4d2.2	[14620]	Gjb3	mCx31
hCx31.1	GJB5	[2709]	1p35.1	4d2.2	[14622]	Gjb5	mCx31.1
hCx32	GJB1	[2705]	Xq13.1	Xd-f4	[14618]	Gjb1	mCx32
				Xf4	[414089]	Gja6	mCx33
hCx36	GJA9	[57369]	15q14	2f3	[14617]	Gja9	mCx36
hCx37	GJA4	[2701]	1p35.1	4d2.2	[14612]	Gja4	mCx37
hCx40.1		[219770]	10p11.21	18a1	[225152]		mCx39
hCx40	GJA5	[2702]	1q21.1	3f2.1	[14613]	Gja5	mCx40
hCx43	GJA1	[2697]	6q21-q23.2	10b4	[14609]	Gja1	mCx43
hCx45	GJA7	[10052]	17q21.31	11e1	[14615]	Gja7	mCx45
hCx46	GJA3	[2700]	13q11-q12	14c2	[14611]	Gja3	mCx46
hCx47	GJA12	[57165]	1q41-q42	11b1.3	[118454]	Gja12	mCx47
hCx50	GJA8	[2703]	1q21.1	3f2.1	[14616]	Gja8	mCx50
hCx59	GJA10	[81025]	1p34	4a5	[14610]	Gja10	mCx57
hCx62		[84694]	6q15-q16				

D'après Bosco et al. (2011).

6.2. Propriétés et régulation

Les pores des canaux jonctionnels sont assez larges (~1.2 nm) pour laisser diffuser une grande variété de molécules cytoplasmiques, c'est-à-dire potentiellement tous les seconds messagers, acides aminés, nucléotides, ions, ainsi que le glucose et ses métabolites. Cependant, il apparaît que les canaux jonctionnels possèdent une sélectivité substantielle concernant la charge des substances diffusibles, même entre des ions monovalents. De plus, les canaux jonctionnels ont une probabilité d'ouverture voltage-dépendante : la plupart des canaux sont ainsi sensibles à une différence de potentiel entre les milieux intracellulaires des deux cellules connectées, alors que d'autres sont sensibles au potentiel membranaire (Herve & Derangeon 2013).

De plus, la probabilité d'ouverture des canaux jonctionnels est également régulée par plusieurs mécanismes. Le calcium a ainsi été le premier agent identifié comme étant capable de causer un découplage des jonctions communicantes (Deleze 1970) (Figure 25). Ce mécanisme implique probablement une interaction entre l'un des domaines des connexines avec la

calmoduline (CaM) liée au calcium (Peracchia *et al.* 1983). Cependant, le mécanisme exact n'est pas encore compris, et pourrait varier selon l'isoforme de connexine considérée (Sosinsky & Nicholson 2005, Oshima 2014).

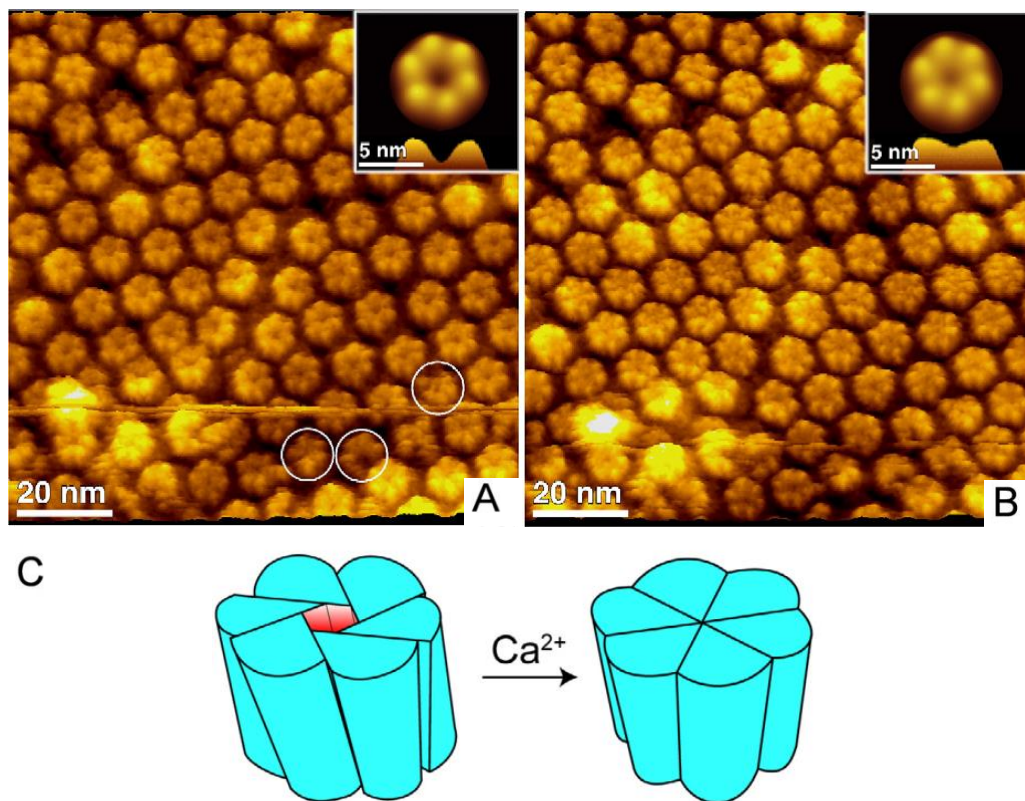


Figure 25 : L'ouverture des canaux jonctionnels est régulée par le calcium

Changements conformationnels d'hémi-canaux composés de connexine 26 à haut et à bas calcium observés en microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy – AFM). **A:** En absence de calcium (0 mM), les pores des connexons sont ouverts. **B:** En présence de 0.5 mM de calcium, le diamètre des canaux est significativement plus faible, reflétant la fermeture des connexons. D'après Sosinsky et Nicholson (2005). **C:** Fermeture du connexon par le calcium selon le modèle de rotation. D'après Oshima (2014).

Les régulations par phosphorylation sont considérées comme un mécanisme majeur de la modulation du couplage agissant à plusieurs niveaux : ces phosphorylations protéiques gouvernent en effet l'adressage des connexines depuis le Golgi jusqu'à la membrane plasmique, l'agrégation des canaux dans des domaines définis de la membrane et préviennent également leur diffusion libre hors des jonctions communicantes. L'endocytose des canaux,

leur dégradation ainsi que leur probabilité d'ouverture sont également régulées de cette façon. En effet, la plupart des connexines sont des phosphoprotéines qui subissent des phosphorylations sur des résidus Serine ou Tyrosine. Plusieurs kinases ont été identifiées dans ce mécanisme, parmi lesquelles PKA, PKC, PKG, p34cdc2, casein kinase 1 (CK1), mitogen-activated protein kinase (MAPK) et pp60Src (Moreno & Lau 2007). Des mécanismes de déphosphorylation entrent également en jeu. Cependant, la modulation des jonctions communicantes apparaît être bien plus complexe que la phosphorylation directe des connexines, et implique très probablement des partenaires protéiques, en raison du manque de corrélation entre le degré de couplage et le degré de phosphorylation observé pour certaines connexines (Herve *et al.* 2004).

Enfin, certaines connexines sont également régulées par voies hormonales et nerveuses dans différents tissus, démontrant que le degré de couplage est adaptatif par rapport à l'état de l'organisme (Herve & Derangeon 2013).

6.3. Les jonctions communicantes dans les îlots

Les cellules β dans les îlots de Langerhans sont exclusivement couplées par des jonctions communicantes formées de l'isoforme connexine 36 (Cx36) chez la souris (Serre-Beinier *et al.* 2000, Ravier *et al.* 2005, Benninger *et al.* 2008) et fortement couplées par Cx36 chez l'Homme (Serre-Beinier *et al.* 2009). Cette isoforme a également été détectée dans les cellules non β des îlots (Serre-Beinier *et al.* 2009). Des études électrophysiologiques montrant la présence d'oscillations synchronisées entre les cellules α et les cellules β suggèrent que ces deux types cellulaires pourraient être couplés entre eux (Le Marchand & Piston 2010), cependant, la preuve directe de la présence de jonctions communicantes n'a été apportée que pour les cellules β (Moreno *et al.* 2005). Dans les îlots de souris, ce couplage apparaît comme étant très hétérogène (Moreno *et al.* 2005, Benninger *et al.* 2008). Cela peut s'expliquer par le fait que les jonctions communicantes par Cx36 étudiées dans les cellules β sont différentes des jonctions communicantes formées par d'autres connexines. En effet, les canaux Cx36 échangent préférentiellement des molécules cationiques (Charpantier *et al.* 2007), sont peu influencés par le potentiel (Perez-Armendariz *et al.* 1991) et ont une faible conductance unitaire

(Moreno *et al.* 2005). De plus, par rapport aux jonctions formées des autres types de connexines, les jonctions formées par la Cx36 ont une probabilité d'ouverture de 0.8% seulement (Marandykina *et al.* 2013).

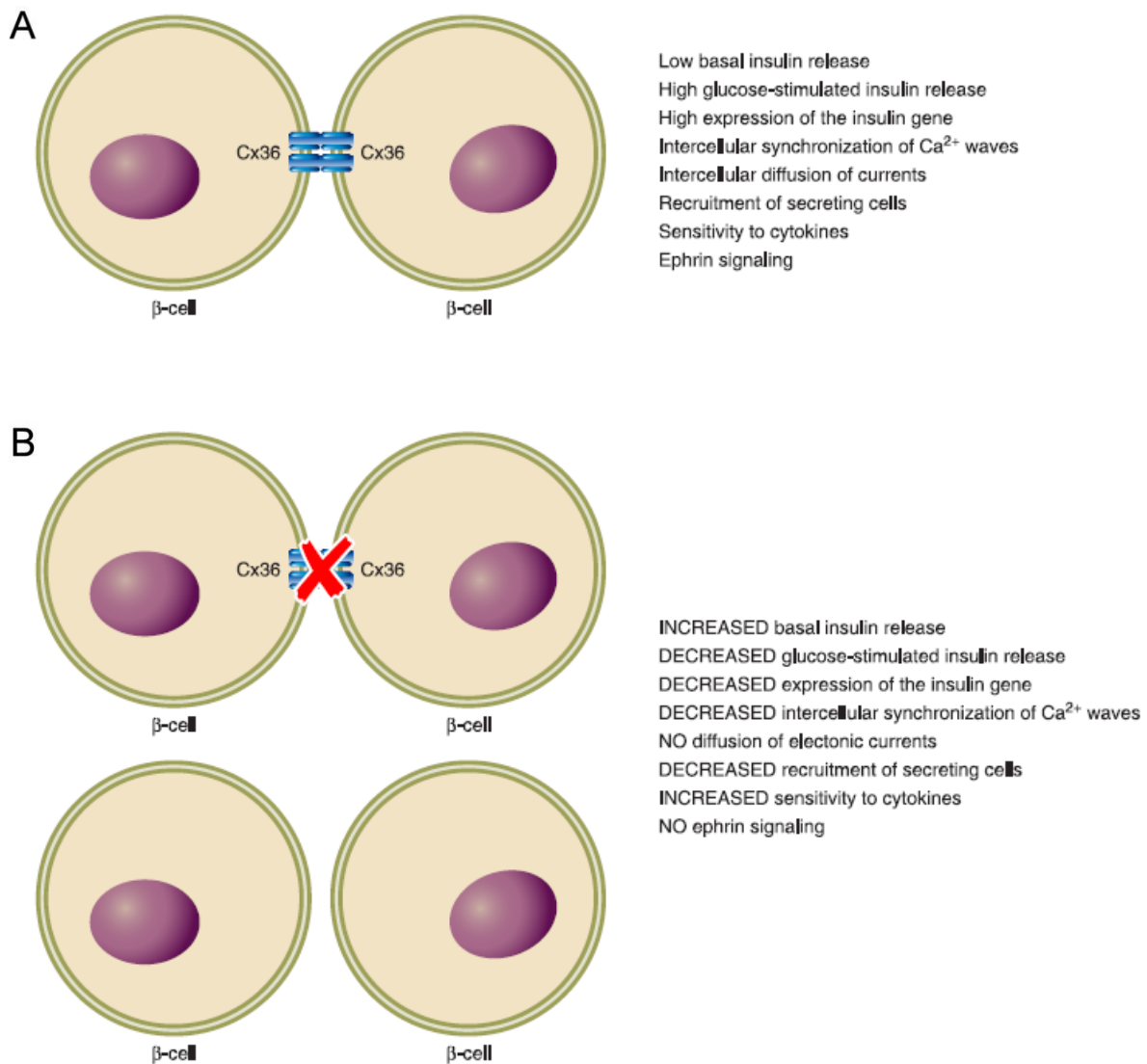


Figure 26 : Effets de la signalisation par la connexine 36 dans les cellules β

A: Les cellules β normales expriment nativement des canaux intercellulaires composés exclusivement de connexine 36. **B:** La suppression de l'expression de la connexine 36 ou le blocage des canaux formés par cette protéine aboutit à des altérations de la sécrétion d'insuline basale et stimulée par le glucose, du recrutement d'autres cellules sécrétrices, de l'expression du gène de l'insuline, de la synchronisation électrique des cellules β et des autres voies de signalisation, ainsi que leur résistance à des conditions environnementales cytotoxiques (parmi lesquelles l'exposition à des cytokines diabétogènes). D'après Bosco *et al.* (2011).

De nombreuses études montrent que le couplage cellulaire opéré par la connexine 36 est crucial au bon fonctionnement des cellules β . En effet, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par des cellules β isolées est fortement diminuée par rapport à la sécrétion d'îlots entiers, leur sécrétion basale d'insuline est au contraire augmentée (Jonkers *et al.* 1999, Bosco *et al.* 2011, Cigliola *et al.* 2012). De même, l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques altère la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les paires de cellules β de rat (Meda *et al.* 1990). L'utilisation de différentes souris transgéniques surexprimant ou au contraire n'exprimant plus le gène de la Cx36 ont confirmé que la Cx36 est nécessaire pour une sécrétion d'insuline normale des îlots, celle-ci étant altérée chez les animaux n'exprimant pas la protéine (Le Gurun *et al.* 2003, Ravier *et al.* 2005) (*Figure 26*). Ces études montrent que le couplage entre cellules β opéré par la Cx36 est essentiel pour la synchronisation des cellules β (notamment des oscillations calciques induites par le glucose) au sein de l'îlot (Calabrese *et al.* 2003) assurant une réponse plus homogène entre les différentes cellules β (Speier *et al.* 2007). Il a été montré que la suppression de l'expression de Cx36 impacte à la fois la première et la seconde phase de la sécrétion d'insuline (Head *et al.* 2012). *In vivo*, des souris transgéniques qui expriment de façon ectopique Cx32 dans les îlots sont intolérantes au glucose et leur îlots sécrètent moins d'insuline en réponse au glucose (Charollais *et al.* 2000), démontrant que l'absence de Cx36 ne peut pas être compensée par une autre connexine qui a au contraire tendance à déréguler d'autant plus le fonctionnement de la cellule β .

Il a été montré chez le rongeur que l'expression de la Cx36 augmente avec l'apparition de cellules β et l'acquisition d'une sensibilité au glucose normale au cours du développement (Leite *et al.* 2005, Carvalho *et al.* 2009). Au contraire, l'expression de la protéine est réduite après un régime riche en graisses qui induit une intolérance au glucose (Carvalho *et al.* 2012). Le taux d'expression de la Cx36 semble donc être un marqueur de la présence de cellules β fonctionnelles. Ceci souligne de nouveau l'importance physiologique de ces structures dans les cellules β .

Enfin, il a été montré que la surexpression de Cx36 protège les cellules β contre l'apoptose induite par des cytokines (Klee *et al.* 2011). Le mécanisme de cette protection, qui pourrait s'expliquer en partie par l'augmentation du couplage intercellulaire, n'est pas encore connu. Cependant, ces résultats indiquent que la Cx36 pourrait être un facteur régulateur de la masse des cellules β , étant donné que l'apoptose est un déterminant majeur de la durée de vie des cellules β .

6.4. Modèles d'étude

Le couplage par la connexine 36 joue un rôle important dans la sécrétion d'insuline en synchronisant les cellules β au sein des îlots de Langerhans. Cette fonction de couplage, qui apparaît en même temps que la fonction β au cours du développement et qui est altérée dans les situations où les cellules β sont dysfonctionnelles, constitue donc un marqueur du fonctionnement physiologique des îlots.

Afin d'étudier l'influence de ce couplage dans la fonction des îlots, plusieurs modèles d'animaux transgéniques ont été utilisés dans les études évoquées plus tôt. Le plus répandu est la souris $Cx36^{-/-}$ dont l'expression de la connexine 36 est supprimée dans l'organisme entier. Étant donné que la connexine 36 est également fortement exprimée dans le système nerveux, des altérations plus globales de la régulation de l'homéostasie pourraient être responsables des modifications constatées dans ce modèle.

Un autre modèle de souris transgénique dont l'expression de la $Cx36$ n'est supprimée que dans la cellule β (Wellershaus *et al.* 2008) (*Figure 27*) permet d'éviter un effet annexe de la manipulation génétique sur d'autres mécanismes de régulation. L'avantage de ce modèle est de fournir trois niveaux d'expression différents de la $Cx36$ dans la cellule β . En effet, les animaux chez lesquels le gène de la $Cx36$ est floxé sans avoir été supprimé par la Cre-recombinase ont des taux d'expression de la $Cx36$ diminués de moitié. De façon intéressante, la sécrétion basale et la sécrétion stimulée par le glucose d'insuline sont altérées dans les îlots des animaux dont le gène est juste floxé, montrant que 50% de l'expression normale de la protéine ne sont pas suffisant pour assurer un fonctionnement normal des îlots (*Figure 28*).

Dans les expériences *in vitro*, il est possible d'inhiber de façon aigüe le couplage en utilisant des bloqueurs des jonctions communicantes (Juszczak & Swiergiel 2009). Dans l'étude des cellules β , les deux bloqueurs qui ont été le plus utilisés sont l'Heptanol-1 et l'acide α -glycyrrhétinique.

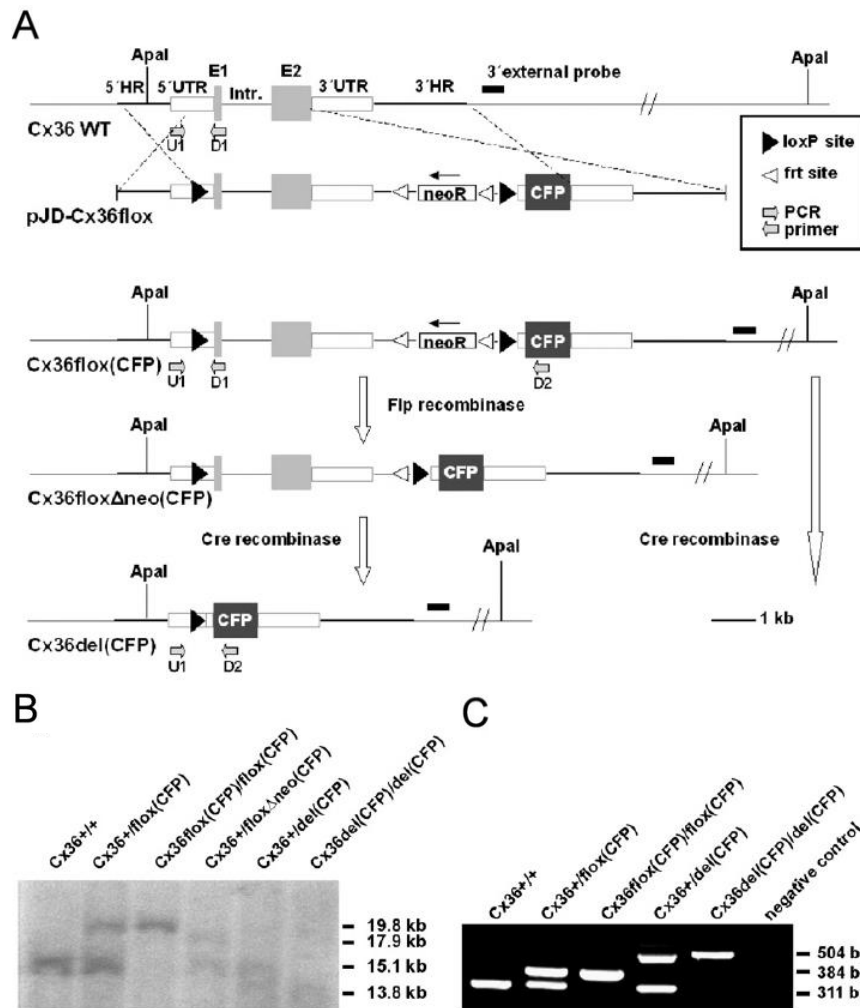


Figure 27: Suppression de l'expression de la connexine 36 dans la cellule β

A: La recombinaison homologue du vecteur cible pJD-Cx36flo dans des cellules souches embryonnaires de souris permet l'ajout d'une cassette de sélection par la néomycine flanquée par des sites frt (\triangleleft) et du gène rapporteur CFP après la région codante pour la Cx36, localisée sur les exons 1 et 2 (E1 et E2). Deux sites loxP (\blacktriangleright) entourent la région codante pour Cx36 et la cassette de sélection, permettant la suppression de ces séquences par la Cre-recombinase. Après la suppression de Cx36 par la Cre-recombinase, CFP est exprimé et fonctionne alors comme un marqueur des cellules Cx36-déficientes. Les sites de clivage par l'enzyme de restriction Apal, les sites d'hybridation de la sonde utilisée pour les analyses Southern blot ainsi que les sites d'hybridation des amorces U1, D1 et D2 utilisées pour l'analyse PCR sont indiqués. **B:** Analyses Southern blot de l'ADN génomique des souris transgéniques. Différents fragments sont détectés après la digestion par Apal: un fragment de 15.1 kb pour le gène sauvage (Cx36^{+/+}), un fragment de 19.8 kb pour l'allèle floxé par les sites loxP Cx36^{flox(CFP)}, un fragment de 17.9 kb après la suppression de neoR par la Flp-recombinase (Cx36^{floxΔneo(CFP)}), et un fragment de 13.8 kb pour l'allèle Cx36^{del(CFP)} après la suppression par la Cre-recombinase. **C:** Les différents génotypes ont été identifiés par PCR, qui a généré un amplicon de 311 paires de bases (bp) pour l'allèle Cx36 sauvage, un amplicon de 384 pb pour l'allèle floxé, et un amplicon de 504 bp pour l'allèle Cx36^{del(CFP)}. La suppression spécifique de Cx36 dans les îlots est obtenue en croisant les animaux exprimant le transgène recombinant avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur RIP. D'après Wellershaus et al. (2008).

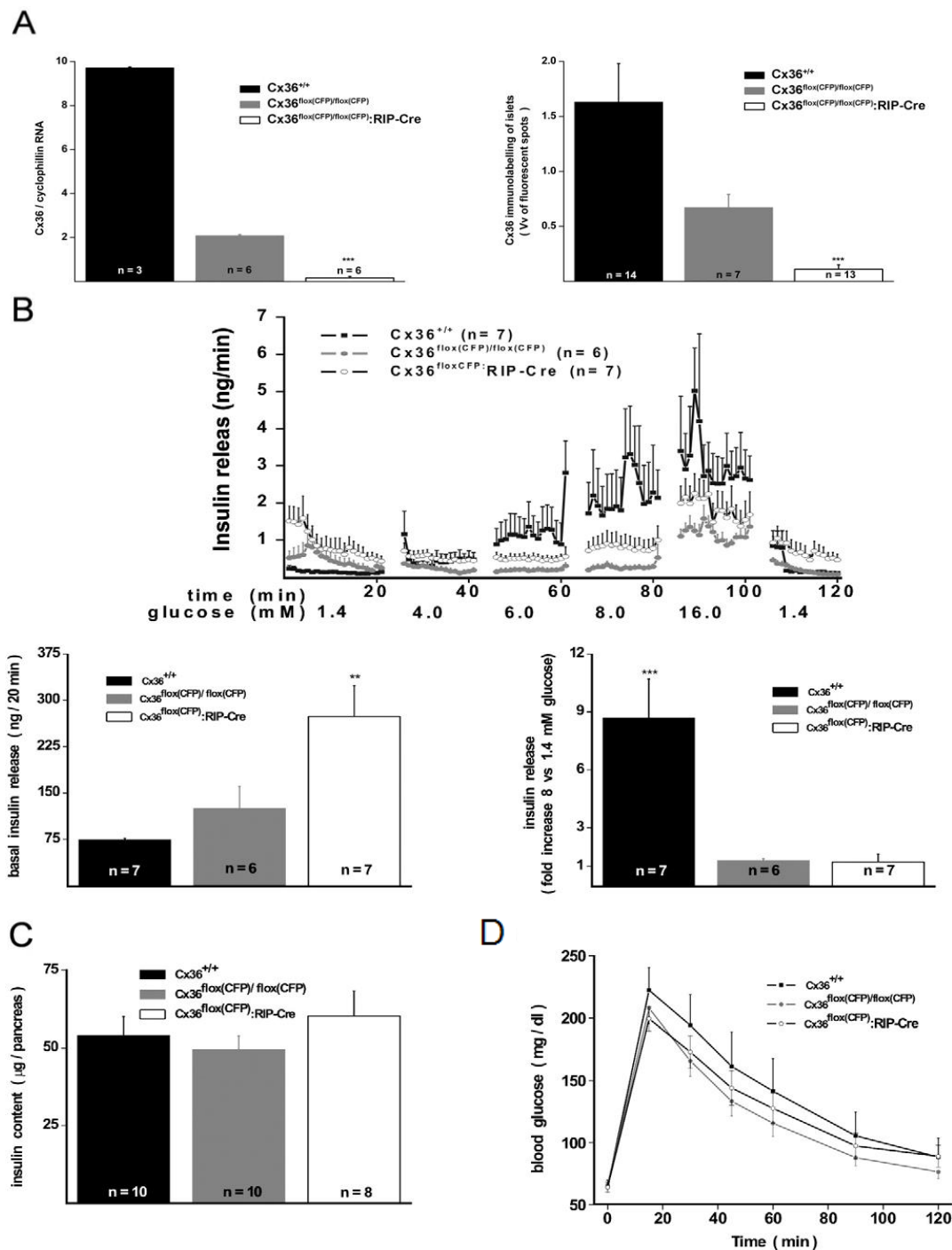


Figure 28 : La connexine 36 est essentielle pour la sécrétion d'insuline

A: Les niveaux d'expression de la Cx36 sont dramatiquement réduits dans les animaux transgéniques, que ce soit au niveau du transcrit (à gauche, quantification par RT-PCR) ou de la protéine (à droite, évaluation quantitative du marquage immunohistochimique pour Cx36). **B:** La sécrétion par le pancréas perfusé des souris transgéniques montrent que la sécrétion d'insuline basale (mesurée à 1.4 mM de glucose) ainsi que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (16 mM) sont altérées chez les animaux transgéniques par rapport aux souris sauvages. **C:** Ces changements de sécrétion se font en dépit d'un contenu en insuline normal dans le pancréas, et **D:** n'affectent pas la tolérance des animaux à une administration aiguë de glucose. Cx36^{+/+}, souris sauvages ; Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}, souris exprimant l'allèle floxé ; Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP);RIP-Cre}, souris invalidées pour la Cx36 spécifiquement dans la cellule β. D'après Wellershaus et al. (2008).

7. L'ACTIVITÉ OSCILLATOIRE DE LA CELLULE β

7.1. L'intérêt des signaux oscillatoires

La synchronisation des cellules β dans les îlots par les jonctions communicantes et de potentiels facteurs diffusibles, et la coordination de l'activité de tous les îlots par régulations nerveuse et hormonale aboutit à une sécrétion d'insuline présentant un patron de libération oscillatoire : on parle de pulsatilité de la sécrétion d'insuline (Song *et al.* 2000).

La plupart des mécanismes dans l'organisme fonctionne selon des rythmes précis. De multiples rythmes sont retrouvés à tous les niveaux de l'organisme (subcellulaire, cellulaire, organe, multi-organe, voire l'organisme entier), et les fréquences de ces rythmes sont très variées, allant de quelques secondes (rythmes de l'activité cérébrale pendant le sommeil par exemple) à plusieurs semaines voire mois (rythmes saisonniers). Du point de vue des mécanismes cellulaires, la plupart des voies métaboliques impliquent des oscillations, dictées par l'activité d'un des acteurs moléculaires.

Les signaux oscillatoires présentent plusieurs avantages : ils permettent d'encoder l'information de multiples façons assez facilement et en économisant le nombre d'acteurs impliqués. Si les signaux étaient au contraire stables, il faudrait en utiliser un nombre incalculable pour encoder une information. Les oscillations permettent d'éviter cela par un codage en termes de fréquences et/ou d'amplitude des signaux. De plus, ces mécanismes oscillatoires évitent, au niveau cellulaire, des phénomènes de désensibilisation des cibles moléculaires impliquées. La diminution d'activité dans les vallées de ces oscillations permettent donc aux différents facteurs de rester réactifs, et évite également une sursimulation qui dans certains cas peut d'avérer toxique (telle que la toxicité induite par un excès de calcium). Enfin, ces oscillations permettent d'économiser l'énergie cellulaire dépensée pour le maintien des flux ioniques lors d'un signal maintenu constant.

Concernant la fonction des îlots, cette pulsatilité revêt également une signification d'efficacité de l'action de l'insuline. En effet, chez l'Homme, 75% au moins de la sécrétion d'insuline se fait de façon pulsatile (Porksen *et al.* 1997). De plus, il a été montré qu'une quantité d'insuline administrée de façon pulsatile était plus efficace à faire diminuer la glycé-

mie par le foie que la même dose infusée de façon constante (Matveyenko *et al.* 2012). La pulsativité de la sécrétion d'insuline revêt donc une importance majeure pour son action subséquente sur ses organes cibles.

Des oscillations de la fonction des cellules β ont été reportées pour plusieurs échelles de temps. Ainsi, les oscillations à court terme du métabolisme et de l'activité sécrétoire du pancréas endocrine s'accompagnent de rythmes beaucoup plus lents tels que des rythmes circadiens autonomes (Bass & Takahashi 2010) ou influencés par les prises alimentaires, voire même des rythmes saisonniers. Ces rythmes plus lents sont également importants car ils régulent l'expression génique.

Nous nous intéresserons ici plutôt aux oscillations à plus court terme qui sont initiées lors de la détection du glucose par la cellule β et qui sont impliquées dans la pulsativité de la sécrétion d'insuline.

7.2. De multiples oscillations dans la cellule β

La pulsativité observée au niveau du pancréas entier perfusé se retrouve également au niveau des îlots lorsque ceux-ci sont extraits du pancréas, et parfois dans la sécrétion d'insuline des cellules β isolées (*Figure 29*) (Tengholm & Gylfe 2009).

Les oscillations présentes dans la cellule β sont observées pour différents mécanismes impliqués dans le couplage stimulus-sécrétion (*Figure 30.A*). Ainsi on retrouve des oscillations de l'activité métabolique (Pralong *et al.* 1994, Kennedy *et al.* 2002, Luciani *et al.* 2006), de l'activité électrique au niveau de la conductance du canal K_{ATP} (Ren *et al.* 2013) ou du potentiel membranaire en bouffées de potentiels d'action (Henquin *et al.* 1982), du calcium ou encore de seconds messagers comme l'AMPc.

Les oscillations recensées ont généralement deux périodes distinctes : les oscillations les plus rapides ont une période de 1 à 2 minutes tandis que les oscillations dites lentes ont une période allant de 4 à 6 minutes en moyenne. Des oscillations mixtes ont également été recensées, comprenant des oscillations rapides superposées à des changements plus lents de l'activité (*Figure 30.B*) (Bertram *et al.* 2010). Les principales oscillations décrites dans la littérature ainsi que leurs fréquences et périodes sont recensées dans le *Tableau 3*.

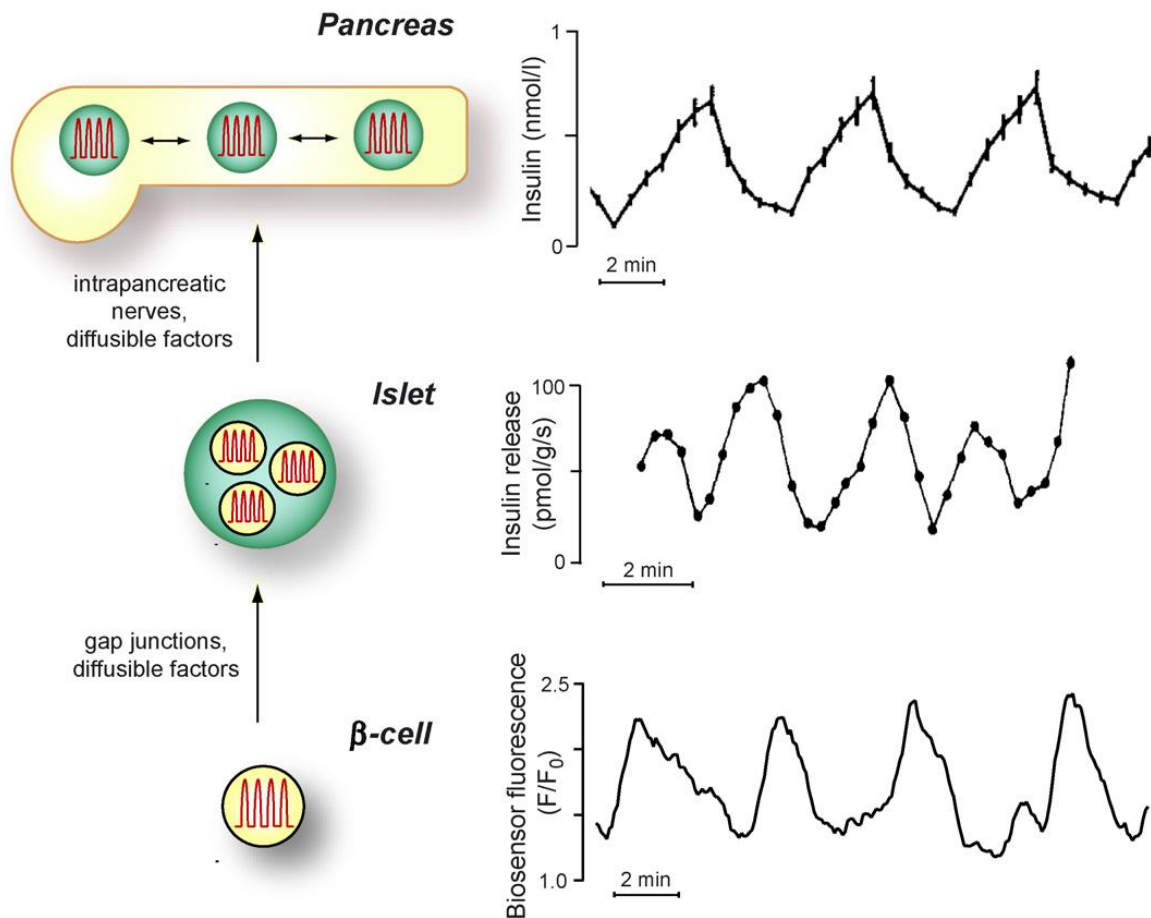


Figure 29 : La pulsatilité de la sécrétion d'insuline se retrouve à différents niveaux

Le panneau supérieur montre une mesure de la concentration d'insuline dans la veine porte du pancréas perfusé chez le rat. La sécrétion pulsatile d'insuline par le pancréas nécessite la coordination de l'activité sécrétoire des îlots individuels par les nerfs intrapancréatiques et des facteurs diffusibles. Le panneau du milieu montre la sécrétion d'insuline d'un îlot isolé. La synchronisation des cellules β par les jonctions communicantes et les régulations paracrines et autocrines est un prérequis pour les oscillations de la sécrétion d'insuline au niveau du micro-organe. Le panneau inférieur illustre les oscillations de la sécrétion d'insuline d'une cellule β individuelle mesurée avec un biocapteur de l'activation autocrine des récepteurs à l'insuline. D'après Tengholm et Gylfe (2009).

Pour un même niveau d'observation (par exemple le pancréas perfusé ou l'îlot isolé), les fréquences indiquées sont différentes d'une étude à l'autre, pointant l'influence de la méthode d'échantillonnage choisie pour les mesures de ces oscillations (Porksen *et al.* 1995).

Les oscillations calciques ont été intensivement étudiées étant données qu'elles corrélaient avec la sécrétion pulsatile d'insuline, les mêmes fréquences d'oscillations étant retrouvées au niveau des deux activités (Gilon *et al.* 1993). Cependant, les oscillations calciques

mesurées sont celles de la concentration de calcium cytosolique moyenne. La $[Ca^{2+}]_i$ au repos est ~ 100 nM. Lors d'une stimulation par le glucose, des microdomaines sous-membranaires où la concentration calcique augmente très fortement sont observables (Marsault *et al.* 1997, Rizzuto & Pozzan 2006, Rutter *et al.* 2006). Ces microdomaines se situent certainement au niveau des excitosomes. De forts gradients calciques entre ces microdomaines et le reste du cytosol existent lors de la réponse des cellules β au glucose, se manifestant par un léger décalage de phase entre les oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ sous-membranaire et la $[Ca^{2+}]_i$ cytosolique.

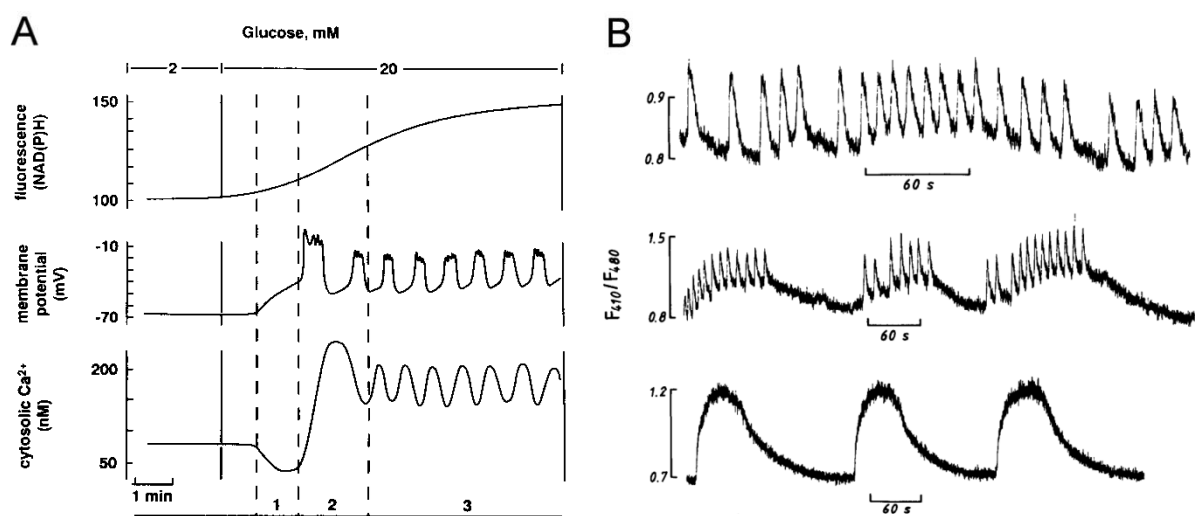


Figure 30 : Les oscillations dans la cellule β

A: Les variations de l'activité métabolique (évaluée par un marqueur fluorescent de la NAD(P)H), de l'activité électrique (potentiel membranaire) et de la concentration cytosolique de calcium sont synchrones dans la cellule β . Les oscillations de l'activité électrique et de la concentration cytosolique de calcium sont corrélées. **B:** Deux types majoritaires d'oscillations calciques sont enregistrés dans les îlots à haut glucose: des oscillations rapides à haute fréquence (panneau supérieur), des oscillations lentes (panneau inférieur). Des oscillations mixtes consistant en des oscillations rapides superposées à des ondes calciques lentes sont parfois observées (milieu). D'après Valdeolmillos *et al.* (1989).

7.3. Il y a-t-il un oscillateur ?

La mise en évidence de ces oscillations au niveau des différentes étapes du couplage stimulus-sécrétion a soulevé une question : lequel des facteurs oscille en premier, induisant ainsi l'oscillation des autres facteurs ? Le métabolisme étant le premier facteur impliqué dans

le couplage stimulus-sécrétion, on peut penser qu'une oscillation de l'activité métabolique est à l'origine de toutes les oscillations observées dans la cellule β . Cependant, il est plus vraisemblable que ces oscillations soient la conséquence de rétrocontrôles entre les différents mécanismes du couplage, formant ainsi un circuit, et qu'il n'y ait aucun mécanisme oscillant tout seul par lui-même.

Une autre question posée par la présence d'oscillations dans les îlots isolés est la notion de pacemaker : il a en effet été montré que les cellules β au sein de l'îlot avaient des réponses très hétérogènes lors d'une stimulation au glucose (Pipeleers 1992, Van Schravendijk *et al.* 1992, Pipeleers *et al.* 1994). Étant donné que la réponse sécrétoire de l'îlot dans son entier est oscillatoire, cela reflète une synchronisation entre les cellules β du micro-organe. Les cellules ayant une activité hétérogène, il est donc probable que les cellules les plus réactives jouent le rôle de pacemaker de l'îlot, en entraînant les autres cellules β par des mécanismes mettant en jeu le couplage par les jonctions communicantes et les contrôles intercellulaires paracrines.

En plus de ces régulations internes aux îlots, la sécrétion d'insuline, et donc sa pulsativité, est modulée par des contrôles nerveux et hormonaux. La cellule β intègre donc les stimuli nutritionnels et les stimuli régulateurs pour émettre sa réponse en tenant compte de l'état de l'organisme entier. Comment la cellule β encode-t-elle tous ces signaux dans sa réponse sécrétoire ?

Plusieurs études ont montré que l'activité électrique en bouffée de la cellule β était corrélée avec la sécrétion d'insuline, notamment la FOPP qui correspond à la durée de la phase active par rapport à la totalité de l'oscillation (Meissner & Schmelz 1974, Ozawa & Sand 1986, Miura & Pernarowski 1995). En clair, la sécrétion serait fonction de la durée pendant laquelle la cellule β est électriquement active. Mais la cellule effectue-t-elle vraiment un codage de l'information selon les bouffées, ou bien la fréquence moyenne du signal peut-elle être suffisante pour contrôler la sécrétion d'insuline ?

La réponse à cette question aura des répercussions sur le développement de futurs algorithmes de détermination de la demande en insuline dans le cadre d'un biocapteur basé sur l'exploitation des signaux électriques des îlots.

Tableau 3 : Les principales oscillations de l'activité du pancréas endocrine

	Measurements	Species	Level	Glucose (mM)	CaCl ₂ (mM)	type	Frequency		References
							converted in Hz	number/time	
Electrical activity	MEA recorded field potential (slow potentials)	mouse	isolated islet cells	15	1.2		0.4-1.2 Hz	1/0.8-1.5sec	<i>cf. PREMIÈRE ÉTUDE</i>
	MEA recorded field potential (slow potentials)	human	isolated islet cells	11	1.5-1.8		0.4 Hz	1/1.5 sec	<i>cf. PREMIÈRE ÉTUDE</i>
	MEA recorded field potential (slow potentials)	mouse	isolated islet cells	15	1.2		0.5 Hz	1/1.5-2sec	Nguyen <i>et al.</i> (2013)
	Extracellular field potential (slow potentials)	mouse	isolated islets	11	0.9		1-2 Hz	1/200-1000ms	Palti <i>et al.</i> (1996)
	Extracellular field potential (slow potentials)	hamster	isolated islets	11	0.9		1-2 Hz	1/200-1000ms	Palti <i>et al.</i> (1996)
	Extracellular field potential (slow potentials)	gerbil	isolated islets	11	0.9		1-2 Hz	1/200-1000ms	Palti <i>et al.</i> (1996)
	MEA recorded APs	mouse	isolated islet cells	15	1.2	fast	4.5 Hz	NC	Nguyen <i>et al.</i> (2013)
	MEA recorded membrane potential (bursts)	mouse	isolated islets	10, 15	2.5		NC	NC	Schönecker <i>et al.</i> (2014)
	MEA recorded membrane potential (bursts)	mouse	isolated islets	10, 15	2.5		NC	NC	Pfeiffer <i>et al.</i> (2011)
	membrane potential patch or sharp	mouse	isolated islets	10	2.5	slow	0.005 Hz	1/3.3min	Beauvois <i>et al.</i> (2006)
	membrane potential patch or sharp	mouse	isolated islets	11	2.56	slow	0.004 Hz	0.25/min	Barbosa <i>et al.</i> (1998)
	membrane potential patch or sharp	mouse	isolated islets	11.1	NC	slow	0.0037 Hz	1/4.6min	Cook (1983)
	membrane potential patch or sharp	mouse	isolated islets	11.1	NC	slow	0.0667 Hz	1/15sec	Cook (1983)
	membrane potential patch or sharp	mouse	single β cells	10	NC	slow	0.0049 Hz	1/203s	Henquin <i>et al.</i> (1982)
	membrane potential patch or sharp	mouse	single β cells	15	NC	slow	0.0043 Hz	1/235s	Henquin <i>et al.</i> (1982)
	K _{ATP} conductance at -60mV	mouse	single β cells	11.1	3	slow	0.0052 Hz	1/3.2min	Ren <i>et al.</i> (2013)
	K _{ATP} activity	mouse ^{ob/ob}	single β cells	10	2.56	slow	0.0042 - 0.0167 Hz	1/1-4min	Larsson <i>et al.</i> (1996)
2 nd messenger	Ca ²⁺ (slow oscillations)	mouse	isolated islets	10	2.5	slow	0.005 Hz	1/3.3min	Beauvois <i>et al.</i> (2006)
	Ca ²⁺ (slow oscillations)	mouse	isolated islets	15	2.5	slow	0.0042 Hz	1/4min	Beauvois <i>et al.</i> (2006)
	Ca ²⁺ (low frequency waves with superimposed high frequency oscillations)	mouse	isolated islets	11	2.56	slow	0.0053 Hz	0.32/min	Barbosa <i>et al.</i> (1998)
	Ca ²⁺ (low-frequency and mixed)	mouse	isolated islets	11	2.5	slow	0.0033-0.0083 Hz	0.2-0.5/min	Valdeolmillos <i>et al.</i> (1989)
	Ca ²⁺ slow (group of mice)	mouse	isolated islets	11.1	3	slow	0.0035 Hz	1/4.7min	Nunemaker <i>et al.</i> (2005)
	Ca ²⁺ slow	mouse	isolated islets	10	2.4	slow	0.0056 Hz	1/3min	Jung <i>et al.</i> (2000)
	Ca ²⁺	mouse	isolated islet cells	15	1.5	slow	0.0083 Hz	1/120sec	Ainscow et Rutter (2002)
	Ca ²⁺ in FURA Red-loaded islets	mouse	isolated islets	10	2	slow	0.0035 Hz	1/4.7min	Luciani <i>et al.</i> (2006)
	Ca ²⁺ slow	mouse	isolated islet cells	15	2.5	slow	0.0033 Hz	1/5min	Krippeit-Drews <i>et al.</i> (2000)
	Ca ²⁺	mouse	in vivo	5-10	NC	fast	0.0417 Hz	2.5/min	Fernandez et Valdeolmillos (2000)
	Ca ²⁺ fast (group of mice)	mouse	isolated islets	11.1	3	fast	0.026 Hz	1/0.65min	Nunemaker <i>et al.</i> (2005)

	Measurements	Species	Level	Glucose (mM)	CaCl ₂ (mM)	type	Frequency		References
							converted in Hz	number/time	
2 nd messenger	Ca ²⁺ (high-frequency)	mouse	isolated islets	11	2.56	fast	0.0567 Hz	3.4/min	Barbosa <i>et al.</i> (1998)
	Ca ²⁺ (high-frequency)	mouse	isolated islets	11	2.5	fast	0.033-0.083 Hz	2-5/min	Valdeolmillos <i>et al.</i> (1989)
	Ca ²⁺ fast	mouse	isolated islets	10	2.4	fast	0.0847 Hz	1/11.8 sec	Jung <i>et al.</i> (2000)
	Ca ²⁺ fast	mouse	isolated islet cells	15	2.5	fast	0.0133 - 0.02 Hz	4-6/5min	Krippeit-Drews <i>et al.</i> (2000)
	Ca ²⁺	mouse	isolated islets	16	10	fast	0.025 Hz	1.5/min	Gilon <i>et al.</i> (1993)
	Ca ²⁺	mouse	single β cells	15	2.5	slow	0.0023-0.0045 Hz	0.14-0.27/min	Jonkers <i>et al.</i> (1999)
	Ca ²⁺ fast	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	11	2.56	fast	0.0333 - 0.1167 Hz	2-7/min	Liu <i>et al.</i> (1998)
	Ca ²⁺ slow	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	11	2.56	slow	0.005-0.015 Hz	0.3-0.9/min	Liu <i>et al.</i> (1998)
	Ca ²⁺	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	11	2.56	slow	0.0078 Hz	0.47/min	Bergsten (1998)
	Ca ²⁺	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	11	NC	slow	0.005-0.0083 Hz	0.3-0.5/min	Bergsten (1995)
	Ca ²⁺	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	7-16	2.56	slow	0.0082 Hz	0.49/min	Bergsten (1998)
	Ca ²⁺	mouse ^{ob/ob}	single β cells	11	NC	slow	0.0022-0.0083 Hz	1/2-6min	Grapengiesser <i>et al.</i> (1988)
	Ca ²⁺	mouse ^{ob/ob}	isolated β -cells	20	1.28	slow	0.0037 Hz	1/4.5min	Nilsson <i>et al.</i> (1996)
	Ca ²⁺	rat	isolated islets	20	2	slow	0.0036 Hz	1/4.6min	Longo <i>et al.</i> (1991)
	Ca ²⁺	rat	single β cells	8.3	1.5	fast	0.0233 Hz	1.4/min	Pralong <i>et al.</i> (1994)
Secretion	[cAMP] _{pm}	mouse	single β cells	11, 20, 30	1.3	slow	0.0008 - 0.0056 Hz	0.05-0.4/min	Tian <i>et al.</i> (2011)
	plasma insulin	human	in vivo	NC	NC	slow	0.0013 Hz	1/13min	Lang <i>et al.</i> (1979)
	insulin portal vein	human	in vivo	8	-	slow	0.0033 Hz	1/5min	Song <i>et al.</i> (2000)
	insulin portal vein	rat	in vivo	5.3	-	slow	0.0033 Hz	1/5min	Matveyenko <i>et al.</i> (2008)
	insulin portal vein	rat	in vivo	6.7	NC	slow	0.0037 Hz	0.22/min	Bergsten <i>et al.</i> (2002)
	insulin portal vein	dog	in vivo	5.6	-	slow	0.0033 Hz	1/5min	Matveyenko <i>et al.</i> (2008)
	insulin portal vein	dog	in vivo	NC	-	slow	0.002-0.025 Hz	7.5-9/hr	Porksen <i>et al.</i> (1995)
	insulin (group of mice)	mouse	in vivo	13.1	NC	slow	0.0037 Hz	1/4.5min	Nunemaker <i>et al.</i> (2005)
	insulin	dog	perfused pancreas	4.49	NC	slow	0.0017 Hz	1/10min	Stagner <i>et al.</i> (1980)
	insulin	human	perfused pancreas	NC	NC	slow	0.0017-0.0033 Hz	1/5-10min	Stagner et Samols (1992)
	insulin	dog	perfused pancreas	NC	NC	slow	0.0017 Hz	1/10min	Matthews <i>et al.</i> (1987)
	insulin	human	isolated islets	8-16	2.5	slow	0.0033-0.0041 Hz	1/4-5 min	Ritzel <i>et al.</i> (2006)
	insulin	rat	isolated islets	3	NC	slow	0.0017 Hz	1/9.8min	Marchetti <i>et al.</i> (1994)
	insulin	rat	isolated islets	16.7	NC	slow	0.0016 Hz	1/10.2min	(Marchetti <i>et al.</i> 1994)
	insulin	rat	isolated islets	20	2	slow	0.003 Hz	1/5.4min	(Longo <i>et al.</i> 1991)
	insulin	rat	isolated islets	16.7	NC	slow	0.001 Hz	1/16-20min	(Chou <i>et al.</i> 1992)

	Measurements	Species	Level	Glucose (mM)	CaCl ₂ (mM)	type	Frequency		References
							converted in Hz	number/time	
Secretion	insulin	rat mouse ^{ob/ob}	isolated islets	5.5	NC	slow	0.0067 Hz	0.4/min	(Bergsten & Hellman 1993)
	insulin	mouse	isolated islets	15	10	fast	0.025 Hz	1.5/min	(Gilon <i>et al.</i> 1993)
	insulin	mouse	isolated islets	15	2.5	slow	0.0042 Hz	1/4min	(Beauvois <i>et al.</i> 2006)
	insulin	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	11	NC	slow	0.005-0.0083 Hz	0.3-0.5/min	(Bergsten 1995)
	insulin	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	11	2.56	slow	0.0078 Hz	0.47/min	(Bergsten 1998)
	insulin	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	3,11	1.28	slow	0.0042 Hz	0.25/min	(Ortsater <i>et al.</i> 2000)
	insulin	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	7	2.56	slow	0.0078 Hz	0.47/min	(Bergsten 1998)
	insulin	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	11	2.56	slow	0.0078 Hz	0.47/min	(Bergsten 1998)
	insulin (5-HT amperometric detection)	mouse	isolated islets	11	2.56	fast	0.035 Hz	2.1/min	(Barbosa <i>et al.</i> 1998)
	amperometric currents (exocytosis)	mouse	single β cells	NC	NC		NC	NC	(Smith <i>et al.</i> 1995)
	somatostatin	dog	perifused pancreas	4.49	NC	slow	0.0017 Hz	1/10min	(Stagner <i>et al.</i> 1980)
	glucagon	dog	perifused pancreas	4.49	NC	slow	0.0019 Hz	1/8.6min	(Stagner <i>et al.</i> 1980)
Metabolism	O ₂ consumption fast	mouse	isolated islets	10	2.4	fast	0.0826 Hz	1/12.1sec	(Jung <i>et al.</i> 2000)
	O ₂ consumption fast	mouse	isolated islets	10	2.4	fast	0.0826 Hz	1/12.1sec	(Jung <i>et al.</i> 1999)
	islet P O ₂ fast	rat	in vivo	6.7	NC	fast	0.0517 Hz	3.1/min	(Bergsten <i>et al.</i> 2002)
	O ₂ consumption	rat	isolated islets	20	2	slow	0.003 Hz	1/5.3min	(Longo <i>et al.</i> 1991)
	O ₂ consumption slow	mouse	isolated islets	10	2.4	slow	0.005 Hz	1/3.3min	(Jung <i>et al.</i> 2000)
	O ₂ consumption slow	mouse	isolated islets	10	2.4	slow	0.005 Hz	1/3.3min	(Jung <i>et al.</i> 1999)
	O ₂ consumption	mouse ^{ob/ob}	isolated islets	3, 11	1.28	slow	0.0043 Hz	0.26/min	(Ortsater <i>et al.</i> 2000)
	islet PO ₂ slow	rat	in vivo	6.7	NC	slow	0.0035 Hz	0.21/min	(Bergsten <i>et al.</i> 2002)
	lactate	rat	isolated islets	5.5, 16.7	NC	slow	0.00083-0.001 Hz	1/16-20min	(Chou <i>et al.</i> 1992)
	Glucose-6-Phosphate	mouse ^{ob/ob}	isolated β -cells	20	1.28	slow	0.0037 Hz	1/4.5min	(Nilsson <i>et al.</i> 1996)
	glucose consumption slow	mouse	isolated islets	10	2.4	slow	0.0053 Hz	1/3.1min	(Jung <i>et al.</i> 2000)
	glucose consumption fast oscillations	mouse	isolated islets	10	2.4	fast	0.0667 Hz	1/15sec	(Jung <i>et al.</i> 2000)
	citrate (in 5 mM pyruvate)	rat	isolated β -cell mitochondria	0	0	fast	0.0111 Hz	1/1.5min	(MacDonald <i>et al.</i> 2003)
	NAD(P)H	mouse	isolated islets	11.1	2.6	slow	0.0028 Hz	1/5.9 min	(Merrins <i>et al.</i> 2010)
	NAD(P)H in FURA Red-loaded islets	mouse	isolated islets	10	2	slow	0.0036 Hz	1/4.6min	Luciani <i>et al.</i> (2006)
	NAD(P)H in non-loaded islets	mouse	isolated islets	10	2	slow	0.0033 Hz	1/5.1min	Luciani <i>et al.</i> (2006)
	NAD(P)H in non-loaded islets	mouse	isolated islets	20	2	slow	0.0018 Hz	1/9.3min	Luciani <i>et al.</i> (2006)
	NAD(P)H	rat	single β cells	8.3	1.5	slow	0.0217 Hz	1.3/min	Pralong <i>et al.</i> (1994)
	Redox ratio (flavin)	mouse	isolated islets	10	2.6	fast	0.0156 Hz	1/64sec	Merrins <i>et al.</i> (2013)
	Redox ratio (flavin)	mouse	isolated islets	10	2.6	slow	0.0022 Hz	1/7.5min	Merrins <i>et al.</i> (2013)
	mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)	mouse	isolated islets	10	2	slow	0.0034 Hz	1/4.9min	Luciani <i>et al.</i> (2006)

	Measurements	Species	Level	Glucose (mM)	CaCl ₂ (mM)	type	Frequency		References
							converted in Hz	number/time	
Metabolism	mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)	mouse	isolated islets	11.1	3	slow	0.0037 Hz	1/271sec	Nunemaker et Satin (2004)
	mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)	mouse	single β cells	11.1	3	slow	0.0056 Hz	1/180sec	Nunemaker et Satin (2004)
	mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)	mouse	isolated islet cells	15	2.5	fast	0.0133 - 0.02 Hz	4-6/5min	Krippeit-Drews <i>et al.</i> (2000)
	mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)	mouse	isolated islet cells	15	2.5	slow	0.0033 Hz	1/5min	Krippeit-Drews <i>et al.</i> (2000)
	[ATP] _{pm}	mouse	isolated islets	11	1.3	slow	0.0042 Hz	1/4min	Li <i>et al.</i> (2013)
	ATP	human	isolated islet cells	3	1.5	fast	0.0156 Hz	1/66sec	Ainscow et Rutter (2002)
	ATP	human	isolated islet cells	15	1.5	slow	0.006 Hz	1/167sec	Ainscow et Rutter (2002)
	ATP	mouse	isolated islet cells	15	1.5	fast	0.0083 Hz	1/120sec	Ainscow et Rutter (2002)
	ATP/ADP ratio	mouse ^{ob/ob}	isolated β -cells	20	1.28	slow	0.0037 Hz	1/4.5min	Nilsson <i>et al.</i> (1996)
	Phosphokinase M2 activity	mouse	isolated islets	10	2.6	slow	0.0026 Hz	1/6.3min	Merrins <i>et al.</i> (2013)

8. LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DES ÎLOTS

8.1. Introduction

Comment nous l'avons abordé au cours du chapitre précédant, les oscillations de l'activité des îlots se retrouvent à différents niveaux de la séquence d'évènements du couplage stimulus-sécrétion. Comme le montre le *Tableau 3*, ces rythmes peuvent comporter différentes fréquences. Cependant, les fréquences recensées dans la littérature dépendent fortement des propriétés de la technique utilisée (Porksen *et al.* 1995) : une méthode d'enregistrement avec une fréquence d'échantillonnage trop faible ne permettra pas de rendre compte d'oscillations rapides. De plus, il est également nécessaire de pouvoir étudier les oscillations à plus long terme, ce qui dépend de la durée des enregistrements réalisables avec les différentes techniques.

Les îlots sont des capteurs naturels du glucose. Leur utilisation dans un biocapteur de la demande en insuline pourrait être une solution aux problèmes rencontrés avec les capteurs électrochimiques utilisés actuellement (*cf.* chapitre 1). Seulement, pour pouvoir exploiter les îlots dans un tel biocapteur, il faut pouvoir effectuer des mesures de leur activité en continu, avec une résolution assez fine pour détecter des variations rapides, et pendant une durée très longue pour avoir un capteur implantable mesurant la demande en insuline. Le choix de la méthode de mesure est donc crucial dans le développement de ce biocapteur.

Les méthodes optiques ont permis l'étude des oscillations métaboliques et des seconds messagers tels que le calcium ou l'AMPc. Ces techniques reposent sur l'utilisation de sondes protéiques fluorescentes, qui sont chargées à l'intérieur des cellules pour y interagir avec l'espèce à mesurer. Depuis la découverte de la GFP et la conception des premières sondes calciques (Grynkiewicz *et al.* 1985) par Roger Tsien dans les années 1980 (Prix Nobel de Chimie 2008), les protéines fluorescentes n'ont cessé d'être améliorées, permettant des mesures au niveau cellulaire et subcellulaire (Tsien 2009). Certaines de ces sondes peuvent maintenant être cloisonnées à certains compartiments par exemple. Leur utilisation a donc de multiples applications en biologie cellulaire (Grynkiewicz *et al.* 1985), et a permis dans la cellule β de mettre en évidence et de caractériser de multiples oscillations comme les varia-

tions de $[Ca^{2+}]_i$, de l'activité métabolique (mesure de NADH/NAD(P)H, respiration mitochondriale...), ou encore de l'AMPc.

Cependant, bien que les mesures optiques constituent de puissants outils dans l'étude des cellules β , elles comportent certaines limites à une étude plus poussée des oscillations. En effet, l'incubation nécessaire au chargement de la sonde dans les cellules peut entraîner une modification de l'expression génique qui ne peut être contrôlée. D'autre part, comme toutes les méthodes basées sur la fluorescence, le temps d'enregistrement est grandement limité par le photoblanchiment de la sonde utilisée. Cette approche nécessite en outre un appareillage précis, comprenant une source de lumière pour exciter la sonde. L'équipement requis pour ces mesures génère donc de la chaleur, et est difficilement miniaturisable dans le cadre du développement d'un biocapteur. Enfin, la fréquence d'échantillonnage de l'ordre de la milliseconde à une dizaine de millisecondes entraîne une résolution temporelle assez faible, qui ne permet pas d'observer des événements très rapides.

Étant donné que les cellules β génèrent une activité électrique qui implique des courants ioniques, celle-ci peut donc elle aussi être mesurée par électrophysiologie. Les premières études électrophysiologiques réalisées sur les cellules β utilisaient des microélectrodes intracellulaires, dites électrodes sharp, pour enregistrer l'activité électrique de la cellule (Dean & Matthews 1968). Depuis son amélioration par Erwin Neher et Bert Sakmann à la fin des années 1980, le patch-clamp est beaucoup plus utilisé pour étudier l'activité des cellules β . Le patch-clamp est une technique très puissante qui permet l'enregistrement des courants globaux d'une cellule, mais également d'étudier les courants de canaux ioniques unitaires, selon la configuration de patch choisie (Hamill *et al.* 1981). Cette technique a donc été essentielle dans l'identification des canaux impliqués dans l'activité électrique de la cellule β . De plus, cette approche permet de mesurer la capacité de la membrane cellulaire, qui est fonction de la surface de celle-ci, et donne ainsi la possibilité de détecter des événements d'exocytose (la fusion des vésicules entraînant une augmentation de la capacité de la membrane). Cela a beaucoup été utilisé pour étudier la dynamique de la sécrétion d'insuline et pour l'identification des différents pools de vésicules (Gopel *et al.* 2004). De plus, le patch-clamp, mais aussi les enregistrements par Sharp, ont une résolution temporelle beaucoup plus élevée que les méthodes optiques, de l'ordre de la microseconde, et permettent donc d'observer des variations se produisant sur de très courtes durées.

Cependant, l'utilisation du patch-clamp pour étudier les réponses de la cellule β au glucose est assez complexe, car elle nécessite une configuration spécifique, le patch perforé, afin d'éviter une trop grande vidange du milieu intracellulaire, et donc des différents facteurs de couplage, dans la pipette de patch. Cette configuration est techniquement difficile à réaliser et demande une grande maîtrise de l'électrophysiologie pour être réalisée efficacement. De plus, ces méthodes sont invasives et ne permettent que des enregistrements de l'ordre de quelques dizaines de minutes au maximum. Elles ne sont donc pas appropriées à l'étude des mécanismes se déroulant sur de plus longues périodes de temps, tels que les rythmes circadiens par exemple, et ne sont pas applicables au développement d'un biocapteur basé sur la cellule β .

Il faut au contraire pour cela recourir à une méthode la moins invasive possible, permettant la survie cellulaire sur de longues durées afin de procéder à des enregistrements « long-terme » de l'activité des cellules, sur plusieurs jours voire plusieurs semaines. D'autre part, afin d'observer un comportement cellulaire le plus proche de la situation physiologique, la méthode employée ne doit pas nécessiter de charger une sonde (ce qui pourrait induire une transgénèse).

Une manière simple de se libérer de ces contraintes est l'utilisation d'enregistrements électrophysiologiques extracellulaires. Une étude a montré la présence d'oscillations de l'activité électrique des îlots enregistrés au moyen d'une électrode extracellulaire (Palti *et al.* 1996), mais jusqu'à très récemment, aucune autre étude n'avait été réalisée par enregistrements extracellulaires sur les îlots. De plus, les oscillations décrites dans cette étude sont assez différentes, en termes de fréquences, des oscillations lentes ou rapides recensées dans la littérature. De plus récentes études ont étudié l'activité électrique des cellules β en utilisant une autre méthode extracellulaire : les matrices de microélectrodes (Bornat *et al.* 2010, Pfeiffer *et al.* 2011, Raoux *et al.* 2012, Schonecker *et al.* 2014).

8.2. Les matrices de microélectrodes, dites « Multielectrode Arrays » (MEA)

8.2.1. Principe de la technique et signaux enregistrés

Les matrices de microélectrodes, ou en anglais multielectrode arrays (MEA) sont comme leur nom l'indique un assemblage de plusieurs électrodes d'enregistrement. Différents types de MEA existent. Certains sont implantables et permettent un enregistrement des cellules cérébrales *in vivo* (Cheung 2007). Beaucoup de MEAs pour l'étude *in vitro* des cellules existent également pour différents usages (par exemple, l'utilisation d'électrodes en relief pour les enregistrements sur tranches de cerveau de rongeurs). Les MEAs ont surtout été utilisés jusqu'à présent en neurosciences pour étudier notamment les réseaux neuronaux, ainsi que dans l'étude des cardiomyocytes pour étudier la propagation du signal électrique (Spira & Hai 2013). Cependant, l'utilisation des MEAs est de plus en plus envisagée pour des applications de criblage pharmaceutique ou dans le biomédical (Stett *et al.* 2003, Johnstone *et al.* 2010, Jones *et al.* 2010).

Les MEAs enregistrent des variations de potentiel qui se produisent à proximité directe de leurs électrodes. Ces variations de potentiels résultent des multiples flux ioniques à la surface et autour de l'électrode. Le signal détecté par l'électrode est donc un potentiel de champ (Ray 2014).

Les potentiels enregistrés par MEA sont constitués de deux types de signaux : les potentiels d'action, qui reflètent les activités unitaires des cellules à proximité de l'électrode, et le potentiel de champ local, qui résulte de l'activité d'une population de cellules.

Les potentiels d'action enregistrés extracellulairement n'ont pas la même forme que les potentiels d'action enregistrés par patch-clamp et par sharp. En réalité, pour une même cellule enregistrée à la fois de façon intracellulaire et extracellulaire, le potentiel d'action enregistré par l'électrode extracellulaire équivaut à la dérivé première du potentiel d'action enregistré par l'électrode intracellulaire (*Figure 31*) (Bean 2007). De plus, les potentiels d'action enregistrés de façon extracellulaire n'ont pas tous la même forme : celle-ci varie en effet en fonction du contact ou de la distance entre la cellule générant le potentiel d'action et l'électrode, mais également du positionnement de la cellule sur l'électrode : en effet, pour

l'enregistrement de neurones pyramidaux avec des MEAs par exemple, le potentiel d'action enregistré au niveau des dendrites sera différent des potentiels d'action perçus au niveau de l'axone ou des terminaisons synaptiques (Nam & Wheeler 2011, Pettersen *et al.* 2012). Ceci s'explique probablement par l'expression de canaux ioniques distincts à des domaines différents de la membrane.

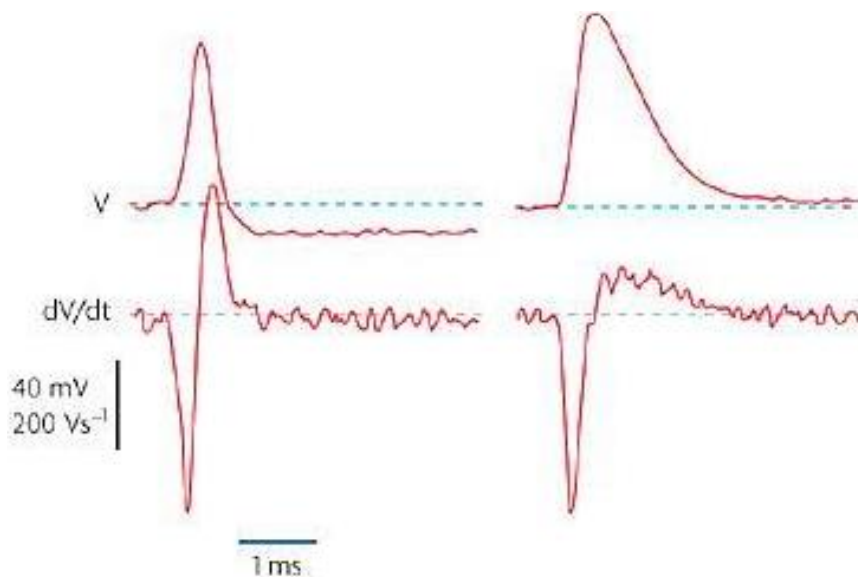


Figure 31 : Le potentiel d'action extracellulaire

Le potentiel d'action enregistré au moyen d'une électrode extracellulaire (ligne inférieure) correspond à la dérivée première du potentiel d'action enregistré de façon intracellulaire (ligne supérieure). D'après Bean (2007).

Les potentiels de champs locaux sont quant à eux des signaux beaucoup plus lents, résultant de l'activité de la population cellulaire entourant l'électrode. Ils correspondent à la sommation des flux ioniques à proximité de l'électrode d'enregistrement. Des rythmes dans le potentiel de champ local sont donc synonymes d'une activité synchronisée des cellules impliquées dans la génération de ce signal (Ray 2014).

8.2.2. Avantage de l'utilisation des MEAs dans l'étude des îlots

Les matrices de microélectrodes résolvent une grande partie des limites des méthodes électrophysiologiques intracellulaires (sharp et patch-clamp) (*Figure 32*). En effet, les électrodes étant extracellulaires, les cellules enregistrées ne sont en rien altérées. Leur viabilité est donc la même que pour des cellules en culture, et des enregistrements long-terme sont donc possibles. Cette approche est également beaucoup plus accessible du point de vue technique étant donné qu'un simple ensemencement des cellules sur les électrodes suffit pour obtenir des signaux, contrairement aux méthodes de patch et sharp qui nécessitent d'approcher et de contacter la cellule à enregistrer avec l'électrode sous l'objectif d'un microscope. Le grand nombre d'électrodes compris dans le MEA permet de plus d'enregistrer plusieurs dizaines de cellules simultanément, chose impossible avec les méthodes intracellulaires. L'approche MEA facilite donc grandement l'échantillonnage statistique. De plus, certains MEAs dotés une forte densité d'électrodes permettent des enregistrements avec une haute résolution spatiale (Imfeld *et al.* 2008).

Cependant, en raison de l'enregistrement extracellulaire des activités cellulaires, le MEA ne donne pas accès aux courants ioniques unitaires. En effet, les électrodes extracellulaires du MEA mesurent une variation de potentiel à leur surface. Celle-ci reflète l'ensemble des courants ioniques qui ont lieu à la surface de l'électrode. Les signaux enregistrés correspondent donc à une sommation des courants ioniques de la (ou des) cellule(s) en contact avec l'électrode. Cependant, cela a un intérêt dans l'étude de la fonction des îlots car permet d'évaluer une réponse intégrée de la cellule.

Un autre problème posé par les MEAs est qu'en raison du grand nombre d'électrodes utilisées simultanément, la quantité de données engendrée est très conséquente. Cela pose un problème du point de vue du stockage des données, mais surtout pour l'analyse de cette masse importante de données. Dans le cadre d'une collaboration entre mon équipe d'accueil et une équipe de micro-électroniciens (dirigée par Sylvie Renaud), des algorithmes de traitement automatique des données ont commencé à être mis en place (Nguyen *et al.* 2013). Dans le cadre de ma thèse, toutes les analyses ont été faites en utilisant un programme d'analyses non automatisé (*cf.* manuscrit de la première étude).

Avec l'utilisation de ces algorithmes automatiques, les enregistrements de l'activité des îlots par MEA offrent de multiples avantages dans le développement d'un biocapteur, un projet en développement dans notre équipe qui sera abordé à nouveau ultérieurement.

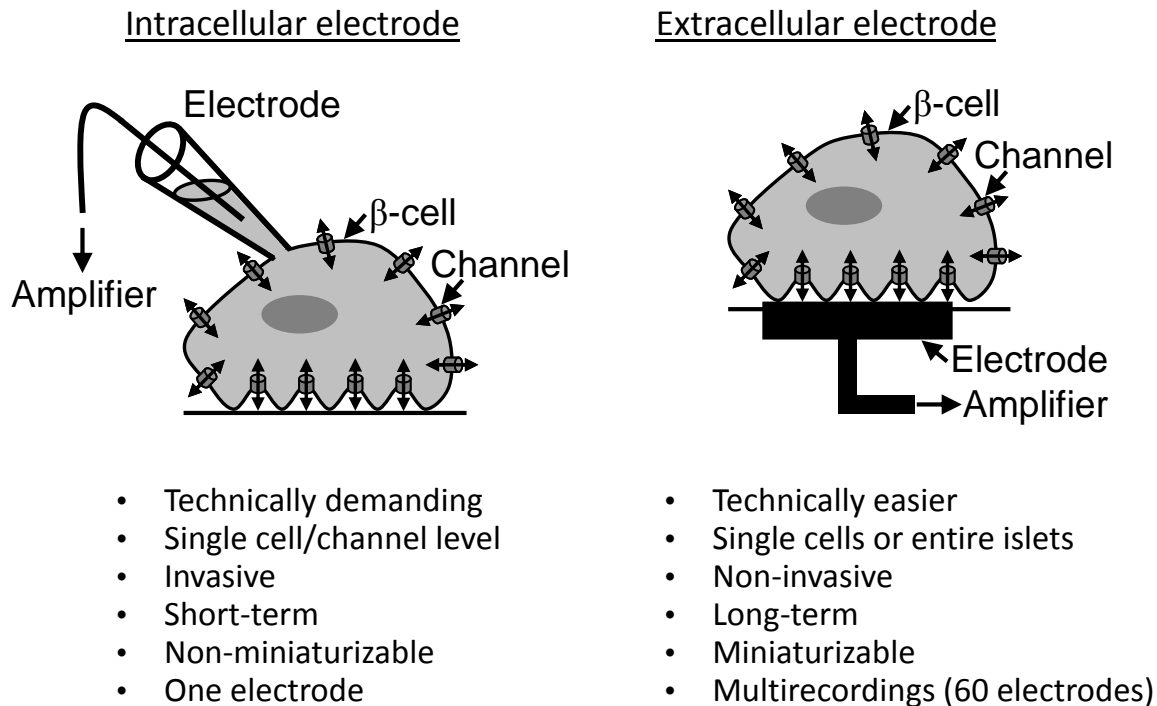


Figure 32 : Propriétés des enregistrements intracellulaires vs extracellulaires

Les enregistrements de l'activité électrique sont réalisables avec les techniques classiques d'électrophysiologie utilisant des électrodes intracellulaires, comme le patch-clamp. Il s'agit là d'une méthode très puissante pour l'étude des courants unitaires de canaux particuliers, mais elle comporte plusieurs limites qui la rendent difficile d'utilisation et incompatible avec l'étude des îlots sur de longues périodes de temps. L'utilisation d'enregistrements extracellulaires par MEA permet de contourner ces limites: contrairement au patch-clamp, l'utilisation des MEAs n'est pas techniquement difficile. L'utilisation d'électrodes extracellulaires n'endommage pas les cellules enregistrées qui peuvent donc être étudiées sur de plus longs laps de temps et sont compatibles avec les enregistrements long-terme. En fonction de la taille des électrodes utilisées, il est possible d'enregistrer l'activité d'une seule cellule ou bien de tout un cluster. De plus, les MEAs étant dotés d'au moins 60 électrodes, cela permet d'enregistrer l'activité de plusieurs cellules/groupes de cellules simultanément.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les études visant à élucider les mécanismes régissant la fonction des îlots ont toujours été limitées par l'étape d'obtention de ce tissu endocrine. Du fait de la faible proportion que représentent les îlots de Langerhans dans la masse exocrine du pancréas, laquelle sécrète des enzymes digestives susceptibles de dégrader les cellules endocrines lors du prélèvement des îlots, l'isolation et la purification de ceux-ci constituent des manipulations techniquement difficiles et qui ne permettent jamais d'obtenir des tissus endocrines purs à 100%.

Outre la complexité de l'obtention des îlots, il reste difficile d'étudier la fonction de ces micro-organes dans leur entier avec une résolution temporelle suffisamment élevée pour comprendre l'ensemble des mécanismes intervenant dans le couplage stimulus-sécrétion. En effet, si les études en biochimie et biologie moléculaire permettent d'identifier les différents acteurs protéiques intervenant à différents niveaux de régulation de la sécrétion d'insuline, d'autres méthodes d'étude sont nécessaires pour observer en temps réel la réponse des îlots à différentes variations de leur milieu. Les mesures de la sécrétion d'insuline par les îlots au cours du temps a permis d'apporter de multiples indications sur la réponse des îlots mais ne renseignent que sur l'étape finale du couplage stimulus-sécrétion.

Comme nous l'avons vu en introduction, l'activité électrique générée par la cellule β fait partie intégrante de ce couplage, et en est d'ailleurs une étape cruciale. En outre, elle constitue la première réponse intégrative de la cellule. En effet, si des étapes plus précoces du couplage stimulus-sécrétion peuvent être étudiées, comme par exemple l'activité mitochondriale, celles-ci ne reflètent que l'activité métabolique de la cellule β . Or, nous avons pu voir que la cellule β intègre nombre de facteurs de régulation amplificateurs, que ceux-ci soient issus du métabolisme ou qu'ils proviennent de régulations neurohormonales, dont l'action n'est pas détectable au niveau du seul métabolisme de la cellule β . En revanche, ceux-ci influent au moins en partie sur l'activité de certains canaux ioniques impliqués dans l'activité électrique de la cellule β . Ainsi de nombreuses études électrophysiologiques ont permis d'améliorer notre vision de la fonction de la cellule insulinosécrétrice.

Cependant, les techniques électrophysiologiques les plus répandues pour étudier la fonction des cellules β ne permettent pas d'étudier l'îlot dans son entier. En effet, les techniques de patch-clamp ou utilisant des microélectrodes sharp n'offrent un accès électrique qu'à la cellule en contact (ou empalée dans le cas du sharp) par l'électrode d'enregistrement, et les études utilisant ces techniques ont souvent été conduites sur des cellules isolées. Cepen-

dant, comme décrit dans l'introduction, les interactions intercellulaires paracrines et autocrines ainsi que le couplage électrochimique opéré par les jonctions communicantes sont des mécanismes cruciaux à la bonne fonction de la cellule β et par extension de l'îlot de Langerhans. La cellule β isolée est donc privée d'une grande partie des régulations advenant dans l'îlot entier, et son activité ne reflète pas celle qu'elle aurait dans son environnement natif multicellulaire. Certains investigateurs ont donc entrepris d'enregistrer les variations de courants ou de potentiels d'une cellule à la surface d'un îlot, la cellule enregistrée bénéficiant de la sorte des multiples régulations ayant lieu au sein de l'îlot. L'utilisation de sondes fluorescentes pour suivre les variations de la concentration calcique intracellulaire par exemple permettent également de suivre la réponse intégrée des îlots.

Cependant, les techniques d'électrophysiologie intracellulaires ou l'utilisation de sondes fluorescentes, bien qu'étant des techniques puissantes ayant permis de grandes avancées dans la compréhension de la physiologie de la cellule β , comportent plusieurs limites qui les rendent incompatibles avec l'étude à plus long terme des îlots. Pour cela, les enregistrements de l'activité électrique des îlots par des électrodes extracellulaires apportent de multiples avantages par rapport aux techniques précédemment évoquées (*cf.* chapitre 8). Mon équipe d'accueil a donc mis au point l'utilisation des matrices de microélectrodes (microelectrode arrays – MEA) pour l'enregistrement des cellules endocrines (*Figure 33*). Cette technique non invasive offre une résolution suffisamment élevée pour étudier les signaux instantanément générés par les cellules enregistrées en réponse à divers stimuli, tout en permettant d'effectuer des enregistrements sur de longues périodes de temps. Des études antérieures dans l'équipe ont démontré la fiabilité des enregistrements extracellulaires de cellules β par MEA, ceux-ci permettant l'enregistrement de potentiels d'action générés par les cellules en réponse au glucose entre autres (Bornat *et al.* 2010, Raoux *et al.* 2011, Quotb *et al.* 2012, Raoux *et al.* 2012). Ces précédentes études menées au laboratoire ont principalement porté sur les signaux électriques générés par des lignées cellulaires insulinosécrétrices issues d'insulinomes de rat : les INS 832-13. Si ces lignées donnent une indication sur ce qu'il peut survenir en situation physiologique, leur physiologie demeure très différente de celle de cellules primaires. Il était donc nécessaire d'étudier également l'activité électrique d'îlots en culture primaire.

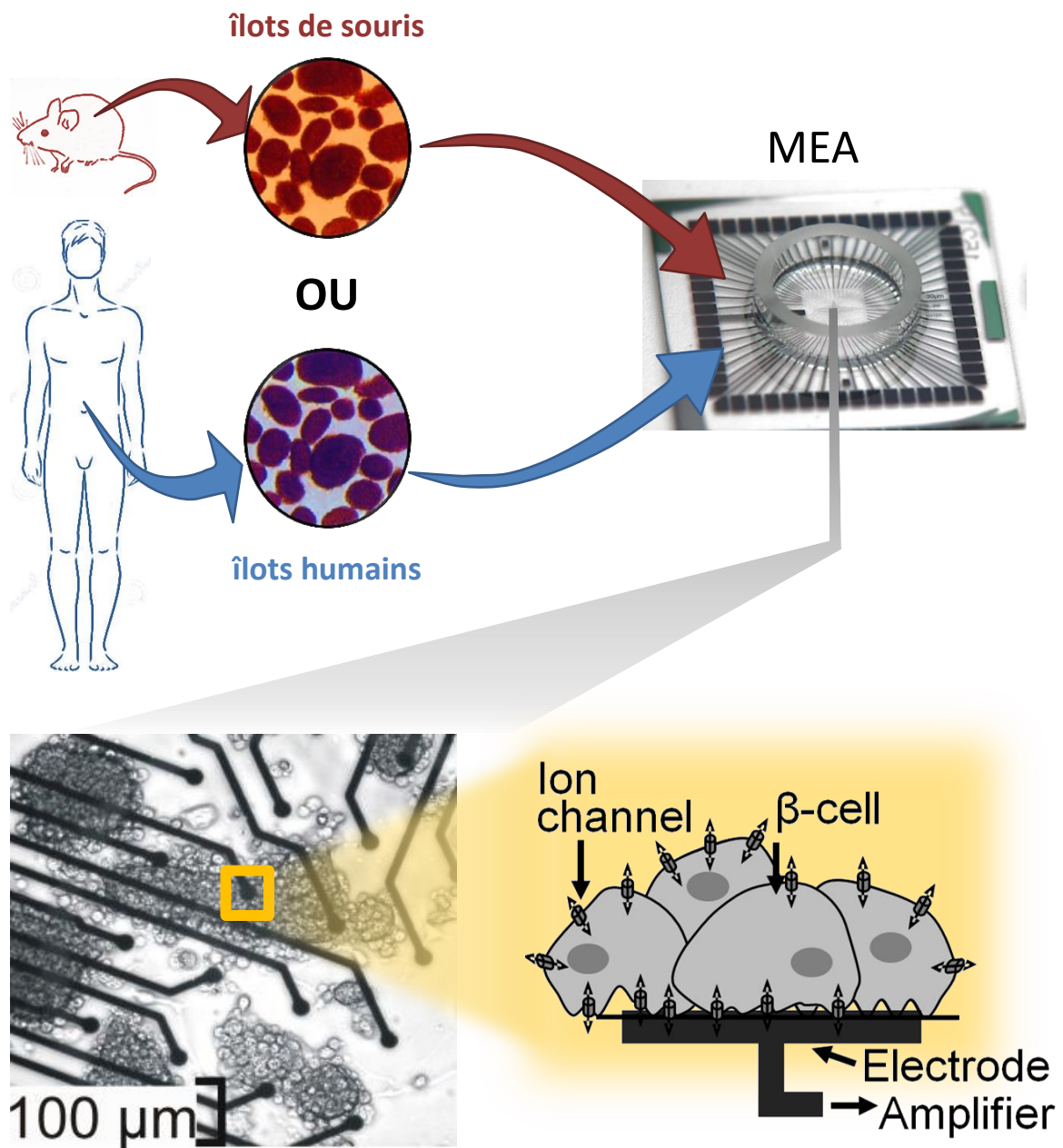


Figure 33 : Principe de l'utilisation des MEAs pour l'étude des îlots

Des îlots sont isolés à partir de pancréas de souris (au laboratoire) ou de donneur humain (à Genève, collaboration GRAGIL, ECIT) puis sontensemencés dans la cuve du MEA, directement sur les électrodes. Après quelques jours de culture, les îlots ont adhéré aux électrodes (la photo en bas à gauche montre des îlots de souris partiellement dissociés en clusters cellulaires et adhérents sur les électrodes d'un MEA). L'activité des canaux ioniques de la membrane des cellules des îlots génère des potentiels de champs qui sont amplifiés et enregistrés par chaque électrode du MEA.

Les signaux enregistrés de façon extracellulaire sont différents des signaux acquis par les techniques de patch-clamp. De plus, les MEAs permettant d'enregistrer les signaux électriques provenant de plusieurs cellules, les potentiels électriques multicellulaires ainsi acquis constituent un signal nouveau qu'il convient de caractériser précisément. En effet, jusqu'à présent, une seule étude électrophysiologique enregistrant les signaux de l'îlot entier avait été conduite, utilisant une méthode tout à fait différente, et qui n'avait pas vocation à caractériser les signaux en question (Palti *et al.* 1996). D'autres investigateurs utilisant également les MEAs pour étudier les îlots entiers ont pour leur part uniquement étudié les activités en bouffée des potentiels d'action (Pfeiffer *et al.* 2011).

Il est nécessaire de bien connaître la nature de ces signaux afin de bien pouvoir exploiter la méthode d'enregistrement par MEA par la suite. Ces signaux pourront être ainsi utilisés pour étudier les régulations de la fonction des îlots se faisant sur de plus longues périodes de temps, telles que les rythmes circadiens, ou encore pour voir si les altérations de la fonction des îlots dans des situations pathologiques, comme par exemple la glucotoxicité, se reflètent au niveau leur activité électrique.

La bonne connaissance de la réactivité des îlots du point de vue électrophysiologique est également nécessaire pour le déroulement d'un autre projet majeur conduit au sein de mon équipe d'accueil en collaboration avec l'équipe en microélectronique dirigée par Sylvie Renaud (Electronics Interfacing Biology, institut de l'Intégration du Matériau au Système, UMR CNRS 5218). Ce projet vise à développer un capteur hybride bioélectronique exploitant les signaux électriques générés par les îlots pour déterminer la demande en insuline dans le cadre d'un traitement du diabète par insulinothérapie. L'exploitation des signaux électrophysiologiques des îlots dans le cadre d'un tel capteur nécessite donc de connaître comment ces signaux sont générés en réponse à diverses variations du glucose, notamment des variations de faible amplitude, ainsi qu'à d'autres facteurs tels que les hormones circulantes.

De nombreuses études ont établi que la réponse en bouffée de potentiels d'action, quantifiée par la fraction de la phase de plateau (FOPP, définie comme la proportion de la durée de la phase active par rapport à la durée totale d'une oscillation) encodait la réponse sécrétoire de la cellule β (Meissner & Schmelz 1974, Ozawa & Sand 1986, Miura & Pernarowski 1995). Cependant, le calcul de la FOPP se fait sur plusieurs minutes à plusieurs dizaines de minutes afin de pouvoir prendre en compte plusieurs bouffées de potentiels

d'action, et n'est donc pas applicable au développement d'un capteur destiné à analyser en temps réel la demande en insuline de l'organisme. De plus, dans les îlots humains, la FOPP est un moins bon indicateur de la sécrétion d'insuline étant donné que le patron de décharge des potentiels d'action sous forme de bouffées y est plus rare que dans les îlots de souris. Afin d'exploiter les signaux électrophysiologiques des îlots dans un tel biocapteur, il est donc nécessaire d'extraire de ces signaux des informations autres que l'activité en bouffées pour coder la demande en insuline. L'enregistrement de ces activités par MEA constitue une nouvelle approche donnant accès à un signal multicellulaire, qui pourrait donc apporter de nouvelles indications quant au codage de l'état de l'organisme par les îlots, et doit donc être caractérisé.

Ainsi, cette thèse a eu pour objectif principal de caractériser les signaux électrophysiologiques générés par les îlots de souris et enregistrés par MEA. En second lieu, il était important de vérifier que les signaux enregistrés chez les îlots de souris étaient également présents dans l'activité électrique générée par les îlots humains, étant donné les multiples différences reportées entre la physiologie des îlots de souris et celle des îlots humains, tant du point de vue de la cytoarchitecture des îlots que de l'expression des canaux ioniques impliqués dans l'activité électrique. Nous avons pu mettre en place un approvisionnement régulier d'îlots humains par une collaboration entre mon équipe d'accueil, le réseau francophone de transplantation d'îlots GRAGIL (Groupe Rhin-Rhône-Alpes-Genève pour la transplantation des îlots de Langerhans) et le consortium européen ECIT (European Consortium for Islet Transplantation). Cette collaboration est menée dans le cadre d'un projet de contrôle-qualité pré-transplantation d'îlots humains (projet ISLETCIP, http://www.agence-nationale-recherche.fr/projet-anr/?tx_lwmsuivibilan_pi2%5BCODE%5D-=ANR-13-PRTS-0017). Ainsi, nous avons pu utiliser la méthode d'enregistrement par MEA pour l'étude de ces tissus humains et commencer la caractérisation des signaux électrophysiologiques extracellulaires ainsi obtenus, ce qui constituait le second objectif de mes travaux de thèse.

Enfin, le dernier axe de mon travail a été de déterminer si l'activité des îlots enregistrée par MEA constitue un bon critère de phénotypage. Dans ce but, j'ai entrepris de caractériser le phénotype électrophysiologique d'îlots issus d'animaux invalidés pour des gènes d'intérêt. Cela permettrait par exemple d'examiner si une souris mutée pour un gène en particulier reproduit les mêmes altérations au niveau du signal électrophysiologique des îlots que celles observées dans des îlots de souris présentant un diabète induit par un régime gras et sucré. L'intérêt du MEA par rapport aux méthodes électrophysiologiques classiques est ici

l'enregistrement sur de multiples électrodes simultanément, permettant des études beaucoup plus rapides, ainsi que la possibilité d'enregistrements assez longs qui permettent de détecter des altérations du signal se produisant sur une échelle de plusieurs heures. Dans cette optique, j'ai commencé au cours de ma thèse l'étude des signaux électrophysiologiques de la souris transgénique GluK2^{-/-}, invalidée pour la sous-unité GluK2 des récepteurs glutamatergiques ionotropiques de type kaïnate. Cette étude vise d'une part à déterminer si les signaux électrophysiologiques des îlots enregistrés par MEA constituent un bon critère de phénotypage, comme nous venons de le mentionner. D'autre part, elle tente d'élucider si cette sous-unité GluK2, qui est exprimée dans les îlots, joue un rôle important dans leur physiologie.

PREMIÈRE ÉTUDE :

CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU

SIGNAL ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE DANS

LES ÎLOTS ENREGISTRÉS PAR MEA

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE À L'ARTICLE

Les précédentes études utilisant les MEAs réalisées dans mon laboratoire d'accueil ont été conduites principalement sur des cellules clonales de la lignée INS 832-13, quelques rares expériences ayant été conduites également sur des îlots dissociés de souris (Bornat *et al.* 2010, Quotb *et al.* 2012, Raoux *et al.* 2012). Dans les deux modèles, l'activité électrique enregistrée se présentait sous forme de potentiels d'action. À mon arrivée au laboratoire, le Dr. Matthieu Raoux, qui a mis en place les enregistrements par MEA pour l'étude des îlots au cours de son post-doctorat, a étendu le filtrage analogique effectué de façon automatique lors de l'acquisition des signaux, dans l'optique d'obtenir une image plus réaliste des signaux générés par les îlots de souris. Ainsi, d'une gamme de fréquences de 10–3000 Hz, la nouvelle gamme de fréquences enregistrées s'est vue étendue à 0.1–3000 Hz.

Au début de chaque expérience, les cellulesensemencées sur le MEA sont enregistrées pendant quelques minutes dans leur milieu de culture à base de RPMI 1640 afin de vérifier si elles sont électriquement actives. Alors que seuls des potentiels d'action étaient observés jusqu'alors, après la mise en place du nouveau filtre analogique, des oscillations beaucoup plus amples et plus lentes que les potentiels d'action ont pu être observées lorsque les cellules d'îlots de sourisensemencées sur MEAs étaient enregistrées dans leur milieu de culture. Cependant, ces signaux disparaissaient lorsque le milieu était remplacé par une solution saline classiquement utilisée en électrophysiologie (contenant en mM : NaCl 135, KCl 4.8, MgCl₂ 1.2, NaCl₂ 2.5, Hepes 10, glucose >11). Des enregistrements MEA effectués dans une solution assimilable à un milieu de culture simplifié (contenant uniquement du RPMI, de l'Hepes pour équilibrer le pH, et du glucose à concentrations variables) ont permis d'établir que ces oscillations étaient générées à haut glucose, étaient absentes à des concentrations de glucose non stimulantes, et étaient inhibées par l'adrénaline. Ces oscillations présentaient donc les mêmes caractéristiques que la réponse électrique en potentiels d'action générée par les cellules β .

Ces oscillations lentes du potentiel, que nous avons appelées « *Slow potentials* » constituent un signal plus ample et donc plus prononcé que les potentiels d'action, et nous ont donc semblé refléter une signalisation importante dans la physiologie des cellules β . De plus,

les fréquences de ces « *slow potentials* » sont différentes des oscillations de l'activité des cellules β décrites dans la littérature qui sont, elles, beaucoup plus lentes, que ce soit les oscillations métaboliques, calciques, ou même les oscillations du potentiel membranaire enregistrées jusqu'à présent par les méthodes de patch-clamp. Les *slow potentials* constituent donc un signal différent de ces oscillations, possédant potentiellement leur propre signification physiologique distincte de celle des oscillations classiquement répertoriées responsables de la pulsativité de la sécrétion d'insuline.

Ce signal nouveau étant donc différent des autres signaux électrophysiologiques précédemment rapportés, nous avons entrepris de le caractériser afin d'en établir l'intérêt physiologique. Les objectifs de cette étude étaient donc de :

- Caractériser les variations de ces *slow potentials* générés par les îlots de souris en réponse au glucose et définir la sensibilité de cette réponse à de faibles variations de glucose,
- Evaluer les effets sur les *slow potentials* de divers stimulateurs et inhibiteurs connus de l'activité électrique des cellules β ,
- Déterminer l'origine de ce signal mis en évidence grâce aux enregistrements multicellulaires par MEA.

Le point fort de cette étude est qu'elle a été majoritairement conduite sur des cellules primaires comme les îlots de souris. De plus, celle-ci constitue la première étude d'îlots humains sur MEA. Une grande partie de la mise en place de ces approches s'est déroulée au cours de ma thèse.

Ces travaux sur cultures primaires distinguent notre étude de nombreux autres travaux qui utilisent généralement des lignées clonales, notamment en ce qui concerne les expériences de biologie moléculaire et cellulaire ainsi qu'en biochimie.

Les résultats obtenus montrent clairement que les *slow potentials* constituent un signal robuste de l'activité des cellules β , résultant du couplage de celles-ci par les jonctions communicantes, et suggèrent par ailleurs que la demande en insuline de l'organisme est codée au niveau de l'îlot lui-même, non pas par l'organisation de son activité électrique en bouffée, mais plutôt par la fréquence globale des *slow potentials*.

2. MANUSCRIT

Slow potentials encode intercellular coupling and insulin demand in pancreatic beta-cells

Fanny Lebreton^{1,2}, Antoine Pirog³, Isma Belouah^{1,2,#}, Domenico Bosco^{4,5}, Thierry Berney^{5,6},
Paolo Meda^{5,6}, Bogdan Catargi^{1,7}, Sylvie Renaud³, Matthieu Raoux^{*1,2}, Jochen Lang^{*1,2}

¹ CNRS UMR 5248, Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, Allée Geoffrey Saint- Hilaire, F-33600 Pessac, France; ² Université de Bordeaux, 166 cours de l'Argonne, F-33000 Bordeaux, France; ³ CNRS UMR 5218, Institut Polytechnique de Bordeaux, Talence, France ; ⁴ Centre Universitaire Romand de Transplantation, Département de Chirurgie, Hôpital Universitaire de Genève; ⁵ Dpt. de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Centre Médical Universitaire, CH-1211 Genève 4, Suisse; ⁶ Université de Genève, Genève, Switzerland; ⁷ Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service d'Endocrinologie, Bordeaux, France

**These authors contributed equally to this work.*

#Current address: INRA UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, F-33883, Villenave d'Ornon, France

Corresponding author

J. Lang, Université de Bordeaux, CNRS UMR 5248, Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, Batiment B14, Allée Geoffrey St Hilaire, CS90063, F-33615 Pessac, France

3996 words, 50 References, 6 figures, 2 suppl materials

ABSTRACT

Aims/hypothesis. Ion fluxes constitute a major integrative signal in beta-cells that leads to insulin secretion and regulation of gene expression. Understanding these electrical signals is important for the deciphering of the endogenous algorithms used by islets to attain homeostasis and for the design of new sensors for monitoring beta-cell function.

Methods. Mouse and human islets were cultured on multielectrode arrays for 3 to 13 days. Extracellular electrical activities received on each electrode were continuously amplified and recorded for offline characterization.

Results. Differential filtering of recordings performed on MEAs with mouse islets revealed the presence of known action potentials in addition to very robust slow oscillations at physiological concentrations of extracellular calcium. The frequency of these slow potentials (SP) directly correlated with glucose concentration, peaked at 10 mmol/l glucose and was further augmented by picomolar concentrations of GLP-1. Pharmacological tools and the use of beta-cell specific knock-out mice showed that SPs required the action of glucose on K_{ATP} channels, and reflected cell coupling via Connexin 36. Moreover, increasing and decreasing glucose ramps showed a hysteresis with reduced glucose sensitivity during the decreasing phase. SPs were also observed in human islets and could be continuously recorded over 24 hours.

Conclusions/interpretations. This novel electrical signature reflects the syncytial function of the islets and is specific to beta-cells. Moreover, the observed hysteresis provides evidence for an endogenous algorithm naturally present in islets to protect against hypoglycaemia.

Keywords

Electrophysiology, extracellular recordings, Signalling, Glucose homeostasis, Islets of Langerhans

Abbreviations

AP	Action potential	Hept	heptanol-1
Cbx	carbenoxolone	MEA	Multielectrode array
Cx36	Connexin 36	SP	Slow potential
GLP-1	Glucagon-like peptide-1		

Islets play a central role in nutrient homeostasis as both a sensor as well as a storage and release site for the principal hormones involved in glucose regulation [1]. Beta-cells are activated by glucose, whose metabolism induces a change in coupling factors, including an increase in the ratio of ATP/ADP leading to the closure of ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channels. The ensuing membrane depolarization drives the opening of voltage-dependent channels [1] and the resulting calcium influx regulates insulin exocytosis as well as gene expression. Beta-cells are an ideal sensor for insulin demand since they are also sensitive to hormones that relay the status of the organism. Incretins, such as GLP-1, act via G-protein coupled receptors to potentiate the electrical response and secretion of insulin [2]. In contrast, stress hormones such as adrenaline reduce electrical activity and hormone exocytosis during physical activity [3]. Therefore, changes in the cell membrane potential represent an integrative signal read-out that encodes the body's demand for insulin.

Glucose-induced metabolism-secretion coupling has been described in great detail and is characterized by oscillations of metabolites, second messengers, membrane potential and insulin secretion, with a frequency in the range of one event per ten seconds to one per minute [4]. Interest in signal oscillations is twofold. First, oscillations might be the base of the endogenous algorithms that beta-cells use for nutrient homeostasis. Second, they are disrupted under pathological conditions, such as lipotoxicity [5] or type 2 diabetes [6]. Investigating integrative signals such as the electrical activity is required for understanding beta-cell signaling and for deciphering the endogenous algorithms used by islets to attain homeostasis. This is of considerable importance for their potential application in therapy and development of novel sensors [7, 8]. Determination of the corresponding frequencies depends on the method employed. Standard electrophysiology approaches require special configurations, such as sharp microelectrodes or perforated patches, to observe glucose-dependent effects. They are time consuming and restricted to the observation of individual cells for a limited time. In contrast, extracellular recordings on multielectrode arrays (MEAs) offer a novel approach for physiological experiments with intact and native islet cells in a multicellular context [7, 9, 10].

Using MEAs, we have characterized integrative electrical signals and found a novel electrical signature of islet cells, slow potentials (SP), which also provides a useful biomarker. SPs reflect the syncytial behavior of the islets and play an important role in glucose

homeostasis. Our findings suggest that insulin demand may be encoded by the overall frequency rather than by the bursting behavior of islets.

METHODS

Chemicals: Chemicals were purchased from Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA) except for GLP-1 (Bachem Bioscience, King of Prussia, PA, USA). Nifedipine and glibenclamide were solubilized in dimethyl sulfoxide and adrenaline in ascorbic acid. The final concentrations of these solvents ($\leq 0.1\%$, v/v) were tested alone and had no effect on SPs.

Animals: Adult (8-80 weeks) C57BL/6 mice were used as wild-type subjects. Age-matched conditional mice floxed (Flox: Cx36Flox(CFP)/Flox(CFP)) or deleted specifically in beta-cells (RIP-Cre: Cx36Flox(CFP)/Flox(CFP):RIP-Cre) for the Connexin 36 (Cx36) gene were from the Geneva colony [11]. All experimental procedures were approved by the French Ministry of Education and Research (No. 01836.01).

Islet isolation and cell culture: 100-200 islets per mouse were obtained and cultured for 2-7 days on Multielectrode Arrays (MEA; MEA100/10-Ti-gr and MEA200/30iR-Ti-gr, Multichannel Systems, Reutlingen, Germany) as either whole islets or partially dissociated islet-cell clusters (>10 cells per cluster), as previously described [12]. The use of human islets for research was approved by the institutional ethics committee of Geneva University Hospitals. Human islets were isolated from 3 cadaveric non-diabetic donors (ESM Table S1) at the Cell Isolation and Transplantation Center (Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland) according to a modified version of the automated method [13]. After transport, they were maintained in suspension for recovery (25°C, 95% O₂, $>90\%$ relative humidity) in CMRL-1066 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 5.6 mmol/l glucose and supplemented with FBS (10% v/v; Eurobio, Courtaboeuf, France), Penicillin-Streptomycin (1% v/v; Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) and L-glutamine (1% v/v; Invitrogen). They were subsequently cultured on MEAs in this medium for 5 to 13 days using the same procedure as for mouse islets. Culture media were renewed every 2-3 days.

Electrophysiology and signal analysis: Extracellular recordings were performed at 37°C as described [12] in a physiological buffer containing (in mmol/l): NaCl 135, KCl 4.8, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 1.2-1.8, HEPES 10 and glucose as indicated (pH 7.4 adjusted with NaOH). Simultaneous analog data were acquired at 10 kHz for all electrodes using a MEA1060-Inv-BC-Standard amplifier (Multichannel Systems; gain: 1100; analog filter: 0.1–3000 Hz) and treated with MC_Rack software (Multichannel Systems, Tübingen, Germany). A 0.2–700 Hz second-order Butterworth digital filter was used to show representative traces (except in Fig 1.e and f). For offline determination of frequencies, SPs were extracted using a 0.2–2 Hz band-pass filter (see Fig 1.f), and detected using the threshold module of MC_Rack with a dead time (minimal period between two events) set to 500 ms. SP frequencies were measured at steady state during the last 3-7 min of each condition.

For long-term recordings, MEAs seeded with human islet cells were connected to the amplifier and placed along with it in a dry incubator (95% O₂) at 37 °C. Recordings were performed without perfusion in culture medium with 7 mmol/l glucose. The MEA was covered with a fluorinated ethylene-propylene membrane (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, New York, USA) in order to permit gas exchange, with evaporation limited to 0.19±0.03% of the total volume per hour (N=7 measures) [14]. Signals were continuously acquired at 2 kHz and SP frequencies were determined offline using the procedure detailed above for successive periods of 10 min and over 24 h duration.

The correlation in Fig. 1g was obtained with MATLAB software (MathWorks, Cambridge, UK). The relative angular position of 4400 APs on their respective SPs was determined for 4 independent experiments in mouse islets stimulated with 11 mmol/l glucose. SPs were extracted by detecting their extrema, and APs were isolated using the wavelet transform's method [10]. The angular position of each AP was then computed between 0 and 180° (rising phase of the SP) or between 180 and 360° (falling phase).

Statistics: Experiments were replicated on at least 3 MEAs with cells from different mice or human organ donors. Results are presented as mean values with SEM for N electrodes. Student's t test was used for paired data. ANOVA with Bonferroni's or Student-Newman-Keuls' correction as a post hoc test were used for comparisons between two or more groups.

RESULTS

The electrical activity produced by islet cells seeded on MEAs (Fig 1a) was recorded as illustrated in Fig. 1b for one electrode. As shown in Fig. 1c, the electrical activity of mouse islets increased when glucose concentration was raised from 3 to 15 mmol/l. A higher temporal resolution of this glucose-induced activity (Fig 1d) revealed the presence of two distinct and superimposed signals: rapid spikes of small amplitude (40-60 ms duration, 10-50 μ V) were previously characterized as action potentials (AP) [10]; on the other hand we found slower oscillations of larger amplitude (800-1500 ms period, 50-350 μ V peak-to-peak), hereafter termed slow potentials (SP). Differential band-pass filtering separated the two signals (Fig. 1e, f). Whereas filtering at 2–700 Hz sorted the short-lasting APs, filtering at 0.2–2 Hz separated out the SPs, and was used for further quantification of SP frequencies. Probably due to their small amplitude, APs were not visible in $32.2 \pm 3.7\%$ of electrodes with SPs (N=20 experiments). When present, APs were downward on the majority of recordings but upward in a few cases (96 vs. 4%, respectively) as in our previous report [10]. Temporal correlations between the two signals showed that APs mainly occurred during the falling (69%) rather than the rising phase (31%) of SPs (Fig. 1f). Both signals were observed without difference in entire islets and islet cell clusters (not shown). Of note, SP amplitudes decreased with increasing concentration of extracellular calcium and were extinguished above 2.5 mmol/l (ESM Fig. S1).

SPs were induced by both 15 mmol/l glucose and 0.1 μ mol/l glibenclamide, but not by 24 mmol/l KCl (Fig 2a), suggesting that SPs depend on glucose-specific mechanisms such as closure of K_{ATP} channels. Glucose-induced SPs were suppressed by nifedipine, an inhibitor of voltage-gated calcium channels (Fig 2b). We also tested the stress hormone adrenaline, a well-known inhibitor of electrical signals in beta-cells and an activator of alpha-cells [10, 15]. SPs induced by glucose were reversibly inhibited by adrenaline (Fig 2b). However, adrenaline did not affect the APs presumably attributed to alpha-cells recorded together with beta-cells on MEA electrodes (Fig 2c). The dependence of SPs on high concentrations of glucose, which inhibit alpha-cell function, indicates that SPs originated from beta-cells (Fig 2c).

We next monitored SPs in response to increasing and decreasing glucose ramps (Fig 3a). The frequency of SPs recorded in the presence of various glucose concentrations was

higher during the increasing (up) than the decreasing (down) ramp (Fig. 3b). SP frequency increased during the rising phase with an EC₅₀ of 7.5 mmol/l and a maximal effect at 10 mmol/l glucose, and then it slowed down during the decreasing phase at a faster rate, resulting in a shift of the EC₅₀ to 8.7 mmol/l. The difference in the kinetics during the increasing versus the decreasing glucose concentration resulted in a hysteresis of the up- and down-curve, which was also observed for the AP frequencies (not shown), consistent with a rapid response of beta-cells to a decrease in glucose levels. We further observed that 0.5 pM GLP-1 increased the frequency of SPs (Fig 3c), with a maximal effect at 50 pM, a concentration in the high physiological range [16].

We next asked whether SPs could be generated by individual beta-cells or required the presence of cell clusters. Glucose-induced SPs were not affected by 100 µmol/l of two inhibitors of purinergic receptors, namely suramin and pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (not shown). In contrast, 50 µmol/l carbenoxolone and 3.5 mmol/l heptanol-1 [17] abolished the glucose-induced SPs in a reversible manner (Fig 4a and b). Of note, glucose-induced APs were not inhibited by 50 µmol/l carbenoxolone, indicating that only SPs depend on gap junction channels.

To further test this hypothesis, we explored the electrical activity of islets from transgenic mice carrying a beta-cell specific knock-out of the gene encoding Connexin 36 (Cx36), the main gap junction channel in beta-cells [11]. Levels of Cx36 and beta-cell coupling for Cx36^{flox}(CFP) wild type (WT), Cx36^{flox}(CFP)/Flox(CFP) (Flox) and Cx36^{flox}(CFP)/Flox(CFP):RIP-Cre (RIP-Cre) littermates were normal, half reduced and nil, respectively [11]. Raising glucose from 3 to 15 mmol/l induced SPs and APs in islets of WT, but not in those of Flox and RIP-Cre mice (Fig. 4c). Thus a 50% decrease in Cx36 levels is sufficient to compromise the generation of SPs.

In view of the differences in ion channels in rodent and human beta-cells [1], we searched for SPs in islets isolated from three organ donors (ESM Table S1). We found that glucose generated APs and SPs in human islets (Fig. 5a), the maximal effect being reached at 8.2 mmol/l (Fig. 5b). As in mouse islets, human SPs were reversibly suppressed by heptanol-1 (not shown). Continuous long-term recordings showed that, in human islets, glucose induced SPs with a very stable frequency over a 24 h period (Fig. 5c).

DISCUSSION

Our study has revealed slow extracellular field potentials induced by glucose in mouse and human islets. As depicted in Fig. 6, SP signals add to the previously described APs [9, 10, 18] when beta-cells are coupled by Cx36 channels [19, 20]. APs are generated at the single-cell level [1] whereas SPs result, like local field potentials in neurons, from complex temporal and spatial summations of ion fluxes around each electrode [21]. The asymmetric temporal repartition of APs on SPs (Fig. 1f) suggests a correspondence between the falling phase of SP and a depolarising stage of coupled beta-cells. In fact, SPs and APs are observed at elevated glucose provided that only beta-cells contact the electrode and are coupled via connexins (Fig 6a). In contrast, only APs are recorded at elevated glucose when coupling is disrupted by pharmacological or genetic intervention (Fig 6b). Contrary to APs, SPs are beta-cell specific, meaning that when an alpha-cell directly contacts the electrode (Fig 6c) APs are apparent at low glucose, whereas the SPs generated by the surrounding beta-cells become apparent at elevated glucose. Thus, SPs reflect the electrical activity and coupling of beta-cells and provide important insights on the endogenous algorithms used by islets to encode the insulin demand.

The presence of APs in activated beta-cells is well known [1]. They can be recorded using arrays of extracellular electrodes [9, 10, 18, 22] and their shape (upward, downward) depends on factors such as strength of cell adhesion and the local population of ion channels at the cell-electrode interface [23]. The MEA-approach reduces the signal/noise ratio of APs. Consequently, registered amplitudes are significantly smaller than those reported by classical intracellular electrophysiological methods [9, 10, 18, 20, 22, 24]. This altered signal/noise ratio renders signal recognition more difficult and requires sophisticated approaches such as wavelets and dynamic filtering [10, 25]. In contrast, the large amplitude of SPs provides an easier recognition with a gain in precision. Similar signals have been previously recorded in rodents using single electrodes, which precludes a large and statistically reliable sampling [26]. This limitation is solved using MEAs [9, 10, 12, 18, 22]. Our data show that this approach is also applicable to human islets despite the many electrophysiological differences [27, 28], and that SPs remain stable during 24-hour continuous recording.

Several lines of evidence indicate that SPs reflect the functional coupling of beta-cells. Since antagonists of purinergic receptors did not alter SPs, the paracrine effect of the ATP co-

released with insulin [29, 30] is not involved. SPs but not APs were suppressed by pharmacological inhibitors of connexins or knock-out of Cx36, the only gap junction protein shown so far to couple beta-cells [11, 31, 32]. Indeed, a 50% decrease in the control islet levels of Cx36 largely reduces glucose-induced insulin secretion [11] and also prevents the generation of glucose-induced SPs as shown here. Although Cx36 is dispensable for the occurrence of oscillations in cytosolic calcium, it is required to synchronize the period and amplitude of these oscillations between cells of an islet [32]. Thus SPs recorded on MEAs reflect the propagation of extracellular current flow between coupled cells which makes them an excellent marker for normal islet function.

The physiological relevance of SPs is supported by their presence at physiological concentrations of extracellular calcium. This also provides a clue as to why these signals have been overlooked so far since most recordings are performed at supra-physiological calcium levels [10, 28]. The sensitivity to the cation is consistent with a role of connexin-dependent coupling in the generation of SPs, as supra-physiological calcium lead to the closure of most connexin channels [33] and to decreased glucose-induced insulin secretion in human islets [34]. Moreover, SPs require the activation of stimulus-secretion coupling typical for beta-cells [1, 27]. SPs were induced by glucose and sulphonylureas secretagogues causing both the closure of K_{ATP} channels and Ca^{2+} oscillations [35-37]. In contrast, SPs are not evoked by high concentrations of KCl, a manoeuvre that probably prevents propagation by clamping all cells at the same potential. Finally, the L-type channel blocker nifedipine abolished SPs, demonstrating that calcium currents underlie these potentials. As calcium influx through L-type channels is also the main trigger of exocytosis, SPs are operationally linked to the secretory response of beta-cells.

SPs were maximally stimulated in the presence of 10 mmol/l glucose. This concentration is lower than that which usually elicits in vitro, in a single or few steps, maximal insulin secretion [30, 38], but is similar to that which attains the same secretory effect using a glucose ramp [39]. The glucose concentrations inducing the maximal frequency of SPs coincide with those observed in humans during an oral glucose tolerance test [40]. GLP-1 and adrenalin increased and decreased SP frequencies, respectively, consistent with their effects on insulin secretion. Note that GLP-1 was effective at physiological picomolar concentrations as found during the post-prandial period [16].

Many glucose-related events feature slow and rapid oscillations in islet cells [4, 41]. The frequencies of SPs are considerably higher, but are of similar duration as those reported recently for simultaneous recordings by optical probes for membrane potential and for calcium oscillations spreading over the islet in mouse pancreatic tissue slices [42]. Our data show that the frequency of SPs immediately depends on the ambient concentration of glucose and GLP-1. Thus, extended recording periods, such as those used in the determination of burst durations, are not necessary to evaluate beta-cell function, which consequently can be determined on-line in real-time. In addition, bursts are less marked in human islets as compared to rodent islets [43]. Our findings therefore indicate that the demand for insulin is encoded by the overall frequency of SPs that are generated by the interplay of multiple cells within each islet. This also provides a novel algorithm which largely reduces computing time for a bio-artificial sensor that might mimic islet cells in real-time.

A further interesting observation concerns the difference of the effect of glucose on SPs during an increasing and a decreasing ramp. The curve is hysteretic, reflecting a reduced sensitivity of the signals towards decreasing glucose levels, reminiscent of that described in man during glucose tolerance tests [40]. This control is presumably beneficial to prevent hypoglycemia as a consequence of a sustained insulin release. As hysteresis was present in isolated islets, this safety mechanism is encoded already in the micro-organ and may occur independently from other regulatory circuits.

In conclusion, our work has identified SPs as a novel biomarker for the rapid and non-invasive testing of isolated islets and islet cell clusters. These novel ‘coupling waves’ specifically reflect the function of beta-cells, and provide for a robust signal whose detection does not require complex transformations and filtering [44, 45]. Since SPs depend on Cx36 expression, which influences the differentiation and secretory function of rodent and human islets [46-48], they should provide a suitable marker for beta-cell monitoring, e.g. prior to transplantation of intact islets or clusters of surrogate insulin-producing cells. Moreover, differentiation of stem cells into islet cells requires complex protocols [49] and on-line monitoring as presented here may be of considerable advantage. The approach may also help to improve algorithms and sensors needed for the development of a therapeutically valuable artificial pancreas [50].

ACKNOWLEDGMENTS.

Human islets were provided through the JDRF award 31-2008-416 (ECIT Islet for Basic Research program). We thank Dr Eileen Pedraza for critical reading of the manuscript. We gratefully acknowledge the help of the Animal Facility of Bordeaux University.

FUNDING.

This work was supported by grants from the French Ministry of Research (to J.L.), FEDER BIODIA (to J.L. and B.C.), the Aquitaine Regional Council (to J.L. and B.C.), the French Research Agency (ANR-10-EMMA-030 and ANR-13-PRTS-0017-06 to J.L. and S.R.), and the Swiss National Science Foundation (310030_141162 to P.M.).

DUALITY OF INTEREST.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

CONTRIBUTION STATEMENT.

F.L. and M.R. designed research, performed experiments, researched data, contributed to discussion and writing of the manuscript; J.L. designed research, contributed to discussion and writing of the manuscript; I.B. and A.P. performed experiments and researched data; D.B., T.B., P.M., B.C. and S.R. contributed to discussion; J.L. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

REFERENCES

- [1] Ashcroft FM, Rorsman P (2012) Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 148: 1160-1171
- [2] Campbell JE, Drucker DJ (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metabolism* 17: 819-837
- [3] Ahren B (2000) Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43: 393-410
- [4] Bertram R, Sherman A, Satin LS (2007) Metabolic and electrical oscillations: partners in controlling pulsatile insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E890-900
- [5] Hodson DJ, Mitchell RK, Bellomo EA, et al. (2013) Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human beta cell connectivity. *J Clin Invest* 123: 4182-4194
- [6] Porksen N, Hollingdal M, Juhl C, Butler P, Veldhuis JD, Schmitz O (2002) Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 1: S245-254
- [7] Raoux M, Bontorin G, Bornat Y, Lang J, Renaud S (2011) Bioelectronic Sensing of Insulin Demand Biohybrid Systems. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 191-202
- [8] Renaud S, Catargi B, Lang J (2014) Biosensors in Diabetes : How to get the most out of evolution and transpose it into a signal. *IEEE Pulse* 5: 30-34
- [9] Bornat Y, Raoux M, Boutaib Y, et al. (2010) Detection of electrical activity of pancreatic beta-cells using micro-electrode arrays. In: 5th IEEE Int Symposium on Electronic Design, Test & Applications - DELTA 2010, Ho Chi Minh City, VietNam, pp 233-236
- [10] Raoux M, Bornat Y, Quotb A, Catargi B, Renaud S, Lang J (2012) Non-invasive long-term and real-time analysis of endocrine cells on micro-electrode arrays. *J Physiol* 590: 1085-1091
- [11] Wellershaus K, Degen J, Deuchars J, et al. (2008) A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells. *Exp Cell Res* 314: 997-1012
- [12] Nguyen QV, Caro A, Raoux M, et al. (2013) A novel bioelectronic glucose sensor to process distinct electrical activities of pancreatic beta-cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2013: 172-175
- [13] Bucher P, Mathe Z, Morel P, et al. (2005) Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation. *Transplantation* 79: 91-97
- [14] Potter SM, DeMarse TB (2001) A new approach to neural cell culture for long-term studies. *J Neurosci Methods* 110: 17-24
- [15] De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, et al. (2010) GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca^{2+} channel-dependent exocytosis. *Cell Metabolism* 11: 543-553
- [16] Vilsboll T, Krarup T, Sonne J, et al. (2003) Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2706-2713
- [17] Meda P, Bosco D, Chanson M, et al. (1990) Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J Clin Invest* 86: 759-768
- [18] Pfeiffer T, Kraushaar U, Dufer M, et al. (2011) Rapid functional evaluation of beta-cells by extracellular recording of membrane potential oscillations with microelectrode arrays. *Pflugers Arch* 462: 835-840

- [19] Charollais A, Gjinovci A, Huarte J, et al. (2000) Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest* 106: 235-243
- [20] Zhang Q, Galvanovskis J, Abdulkader F, et al. (2008) Cell coupling in mouse pancreatic beta-cells measured in intact islets of Langerhans. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 366: 3503-3523
- [21] Buzsaki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Rev Neurosci* 13: 407-420
- [22] Schönecker S, Kraushaar U, Dufer M, et al. (2014) Long-term culture and functionality of pancreatic islets monitored using microelectrode arrays. *Integr Biol (Camb)* 6: 540-544
- [23] Nam Y, Wheeler BC (2011) In vitro microelectrode array technology and neural recordings. *Crit Rev Biomed Eng* 39: 45-61
- [24] Meissner HP, Schmelz H (1974) Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets. *Pflugers Arch* 351: 195-206
- [25] Quotb A, Bornat Y, Raoux M, Lang J, Renaud S (2012) NeuroBetaMed: A re-configurable wavelet-based event detection circuit for in vitro biological signals. In: *Circuits and Systems (ISCAS), 2012 IEEE International Symposium on*, pp 1532-1535
- [26] Palti Y, David GB, Lachov E, Mida YH, Schatzberger R (1996) Islets of Langerhans generate wavelike electric activity modulated by glucose concentration. *Diabetes* 45: 595-601
- [27] Rorsman P, Braun M (2012) Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual Rev Physiol* 75: 155-179
- [28] Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, et al. (2008) Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57: 1618-1628
- [29] Cigliola V, Chellakudam V, Arabieter W, Meda P (2012) Connexins and beta-cell functions. *Diabetes Res Clin Pract* 99: 250-259
- [30] Hellman B, Dansk H, Grapengiesser E (2004) Pancreatic beta-cells communicate via intermittent release of ATP. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 286: E759-765
- [31] Bosco D, Haefliger JA, Meda P (2011) Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol Rev* 91: 1393-1445
- [32] Meda P (2012) The in vivo beta-to-beta-cell chat room: connexin connections matter. *Diabetes* 61: 1656-1658
- [33] Lopez W, Gonzalez J, Liu Y, Harris AL, Contreras JE (2013) Insights on the mechanisms of Ca^{2+} regulation of connexin26 hemichannels revealed by human pathogenic mutations (D50N/Y). *J Gen Physiol* 142: 23-35
- [34] Squires PE, Harris TE, Persaud SJ, Curtis SB, Buchan AM, Jones PM (2000) The extracellular calcium-sensing receptor on human beta-cells negatively modulates insulin secretion. *Diabetes* 49: 409-417
- [35] Fridlyand LE, Tamarina N, Philipson LH (2010) Bursting and calcium oscillations in pancreatic beta-cells: specific pacemakers for specific mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 299: E517-532
- [36] Larsson O, Kindmark H, Brandstrom R, Fredholm B, Berggren PO (1996) Oscillations in K_{ATP} channel activity promote oscillations in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in the pancreatic beta cell. *Proc Nat'l Acad Sci* 93: 5161-5165

- [37] Grapengiesser E, Gylfe E, Hellman B (1990) Sulfonylurea mimics the effect of glucose in inducing large amplitude oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} in pancreatic beta-cells. *Mol Pharmacol* 37: 461-467
- [38] Henquin JC, Dufrane D, Nenquin M (2006) Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55: 3470-3477
- [39] Fujimoto W, Miki T, Ogura T, et al. (2009) Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated insulin secretion by cyclic AMP in mice. *Diabetologia* 52: 863-872
- [40] Keenan DM, Basu R, Liu Y, Basu A, Bock G, Veldhuis JD (2012) Logistic model of glucose-regulated C-peptide secretion: hysteresis pathway disruption in impaired fasting glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 303: E397-409
- [41] Henquin JC (1990) Role of voltage- and Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in the control of glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 416: 568-572
- [42] Stozer A, Dolensek J, Rupnik MS (2013) Glucose-stimulated calcium dynamics in islets of Langerhans in acute mouse pancreas tissue slices. *PloS One* 8: e54638
- [43] Rorsman P, Braun M (2013) Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Ann Rev Physiol* 75: 155-179
- [44] Ritzel RA, Veldhuis JD, Butler PC (2006) The mass, but not the frequency, of insulin secretory bursts in isolated human islets is entrained by oscillatory glucose exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 290: E750-756
- [45] Porksen N, Nyholm B, Veldhuis JD, Butler PC, Schmitz O (1997) In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts. *Am J Physiol* 273: E908-914
- [46] Carvalho CP, Barbosa HC, Britan A, et al. (2009) Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. *Diabetologia* 53: 1428-1437
- [47] Carvalho CP, Oliveira RB, Britan A, et al. (2012) Impaired beta-cell-beta-cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 303: E144-151
- [48] Serre-Beinier V, Bosco D, Zulianello L, et al. (2009) Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression. *Hum Mol Genet* 18: 428-439
- [49] Efrat S (2013) Recent progress in generation of human surrogate beta cells. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20: 259-264
- [50] Steil GM, Grodsky GM (2013) The artificial pancreas: is it important to understand how the beta cell controls blood glucose? *J Diabetes Sci Technol* 7: 1359-1369

FIGURES

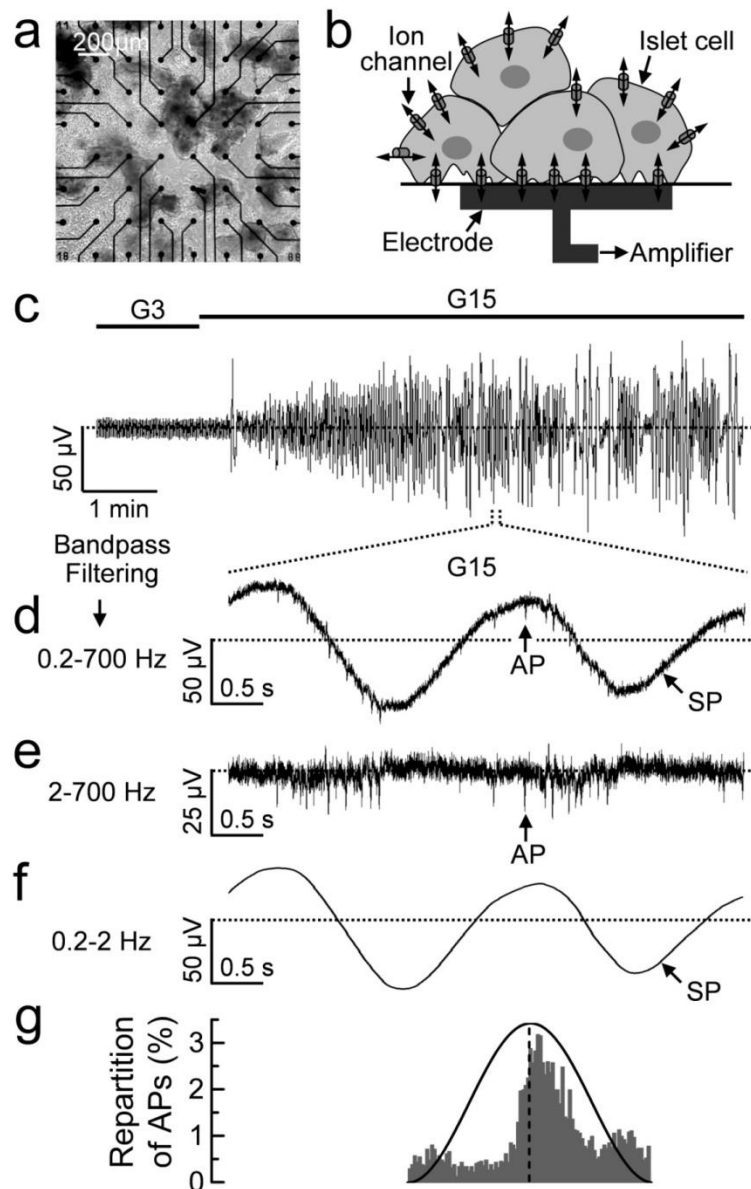


FIG. 1: Mouse islet cells cultured on multielectrode arrays generate 2 types of extracellular electrical signals.

a: Microscope image of a 3-day-old culture of mouse islets is seen on a MEA. Calibration bar, 200 μm . **b:** Scheme of the experimental setting. The activity of channels in the plasma membrane of islet cells generates field potentials that are amplified and recorded by each electrode of the array. **c:** Representative trace showing a recording of the electrical changes in response to a rise in glucose from 3 (G3) to 15 mmol/l (G15). **d-f:** Frequency dependency of glucose-induced signals. **d:** A higher temporal resolution of a portion of the recording in c shows the presence of rapid action potentials (AP) layered on a slower signals, termed slow potentials (SP). Both signals are observed after a large band-pass filtering (0.2–700 Hz). **e** and **f:** Specific band-pass filtering allowed for the isolation of APs (**e**: 2–700 Hz) and SPs (**f**: 0.2–2 Hz). Null-voltages are indicated by horizontal broken lines (**c-f**). **g:** Temporal correlation between APs and SPs showing that APs are more present during the falling than the rising phase of SPs (N=4 independent experiments).

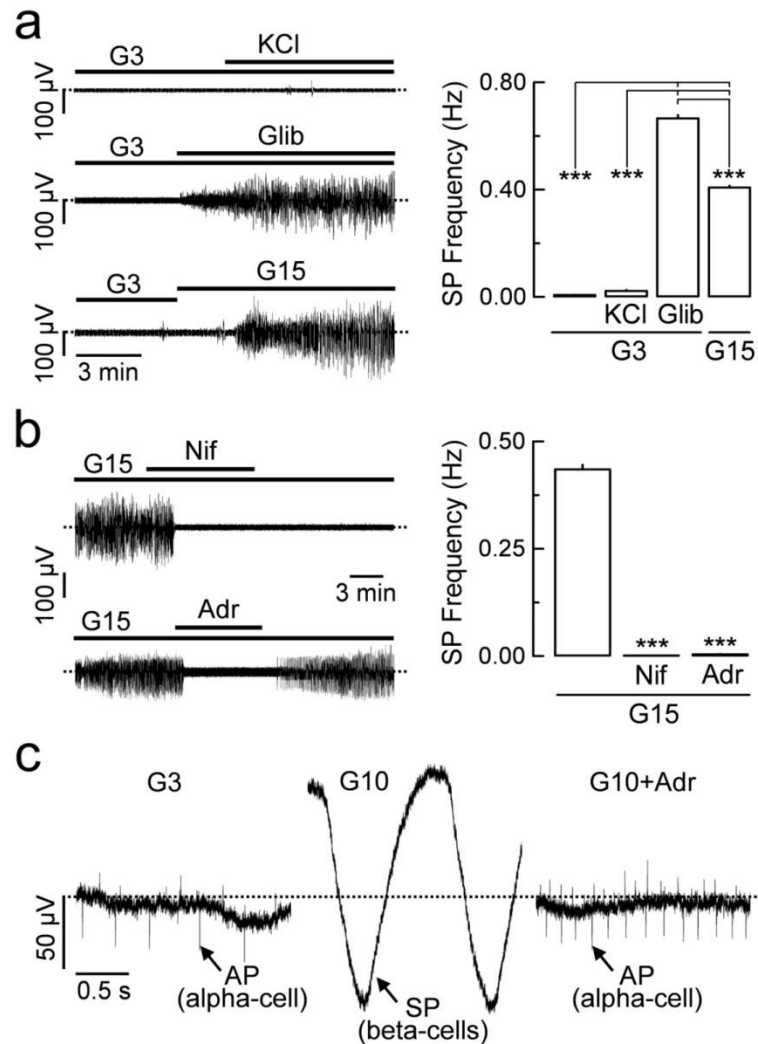


FIG. 2: Slow potentials from mouse islet cells require K_{ATP} as well as voltage-gated calcium channels and are generated by beta-cells.

a: SPs were evoked by 15 mmol/l glucose (G15) or 100 nmol/l glibenclamide (Glib) but not by 3 mmol/l glucose (G3) or 24 mmol/l KCl (KCl). Left: Representative traces for each stimulus. Right: Statistics ($N=95-377$). **b:** Glucose-induced SPs were abolished by 25 μ mol/l of the L-type calcium channel blocker nifedipine (Nif) or 5 μ mol/l adrenaline (Adr). Left: Representative traces. Right: Statistics ($N=53-140$). a and b: ***, $p < 0.001$ (Bonferroni post hoc). **c:** Traces showing that alpha- and beta-cells can be recorded together on the same electrode. APs that are activated in low glucose (G3: 3 mmol/l) and adrenaline (G10+Adr: 10 mmol/l glucose with 5 μ mol/l adrenaline) are attributed to an alpha-cell. SPs that are activated by high glucose (G10: 10 mmol/l) and inhibited by adrenaline represent an electrical signature of beta-cell activity ($N=3$).

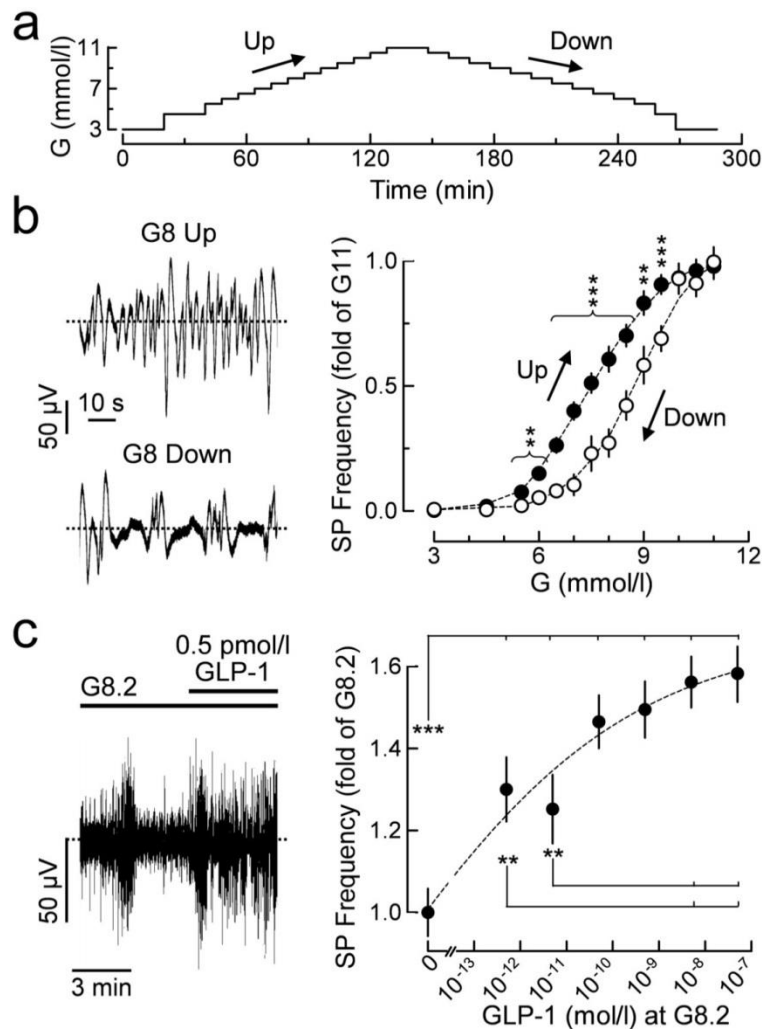


FIG. 3: Slow potentials in mouse islet cells show a hysteretic glucose-dependence and are potentiated by GLP-1.

a: Protocol of the sequential up- and down- glucose ramps used in **b**. **b:** Hysteretic response to glucose. Left: Representative traces showing a higher frequency of SPs in the presence of 8 mmol/l glucose during the increasing (G8 Up) as compared to the decreasing (G8 Down) ramp. Right: Statistics for both increasing (closed circles) and decreasing (open circles) glucose concentrations: N=20; **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ (paired t-test between the up and down values, for each glucose concentration). **c:** Left: Representative trace showing that 0.5 pM GLP-1 increased the frequency of SPs induced by 8.2 mmol/l glucose. Right: Statistics of the effects of GLP-1: N=38-53; **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ (Student Newman-Keuls post hoc).

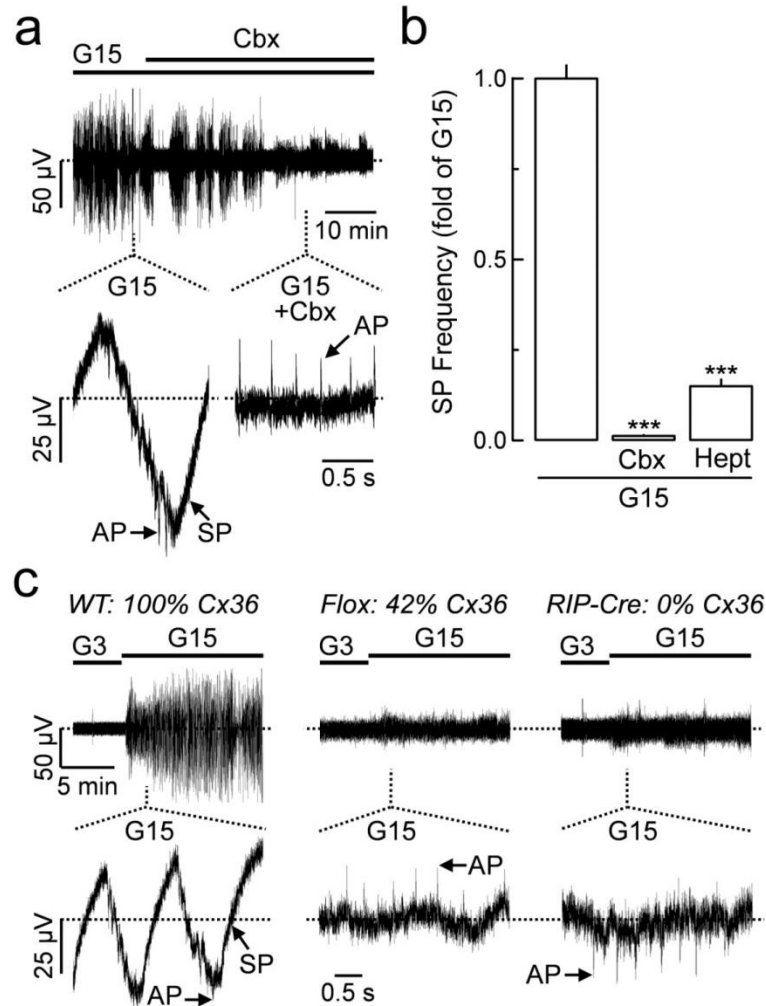


FIG. 4: Slow potentials are dependent on Cx36 gap junction channels.

a and **b**: 50 μ mol/l carbenoxolone (Cbx) or 3.5 mmol/l heptanol-1 (Hept) abolishes glucose-induced SPs. **a**: Representative trace of an experiment testing Cbx (top). Portions of the recording at a higher temporal resolution show that SPs, but not APs, were suppressed by the gap junction blocker (bottom). **b**: Statistics: N=45-137; ***, $p < 0.001$ as compared to G15 without drug (Bonferroni post hoc). **c**: The electrical response induced by 15 mmol/l glucose in islets of wild type (WT) mice were not observed in islets of $Cx36^{Flox(CFP)/Flox(CFP)}$ (Flox) and $Cx36^{Flox(CFP)/Flox(CFP);RIP-Cre}$ (RIP-Cre) mice, which featured reduced and nil levels of Cx36, respectively [11]. Top: Representative traces. Bottom: Higher temporal resolution of electrical signals observed in the presence of 15 mmol/l glucose show the presence of APs but not SPs in the islets of transgenic mice featuring reduced and nil levels of Cx36. Traces are representative of those recorded in 5-8 animals per genotype.

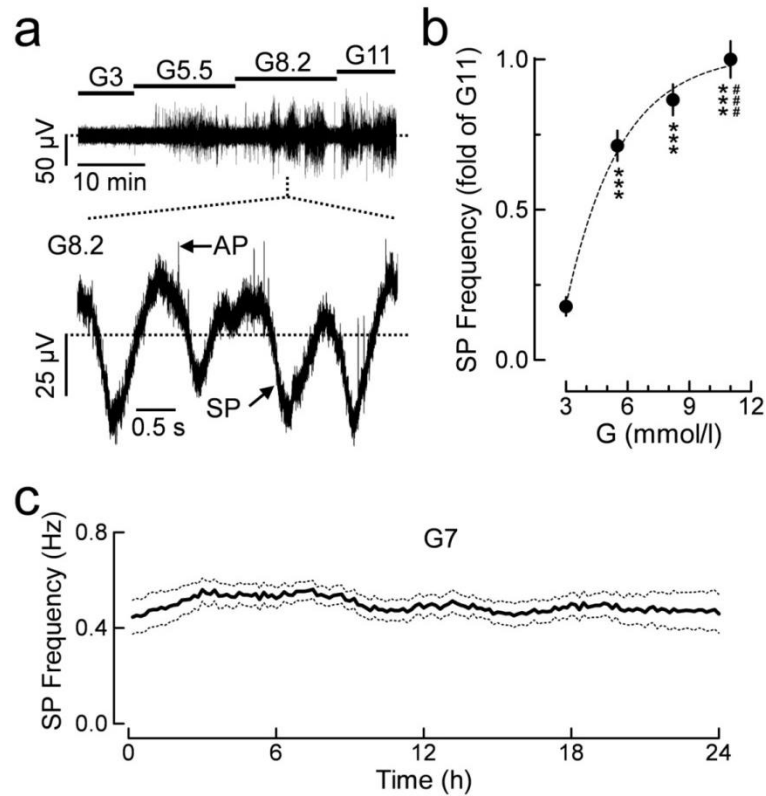


FIG. 5: Human islets show glucose-dependent slow potentials.

a: Representative electrical response of human islet cells to increasing glucose concentrations (upper trace). A higher temporal resolution shows the presence of both APs and SPs at 8.2 mmol/l glucose (lower trace). **b:** Glucose concentration-dependent frequencies of SPs in human islet cells. Statistics on data pooled from 3 donors: N=65; p<0.001 as compared to the value obtained in the presence of 3 (***) or 5.5 (###) mmol/l glucose (Bonferroni post hoc). **c:** A 24 h-long recording shows the stability of the frequency of SPs evoked by 7 mmol/l glucose (G7). Solid line: mean SP frequency, dashed lines: SEM (N=12).

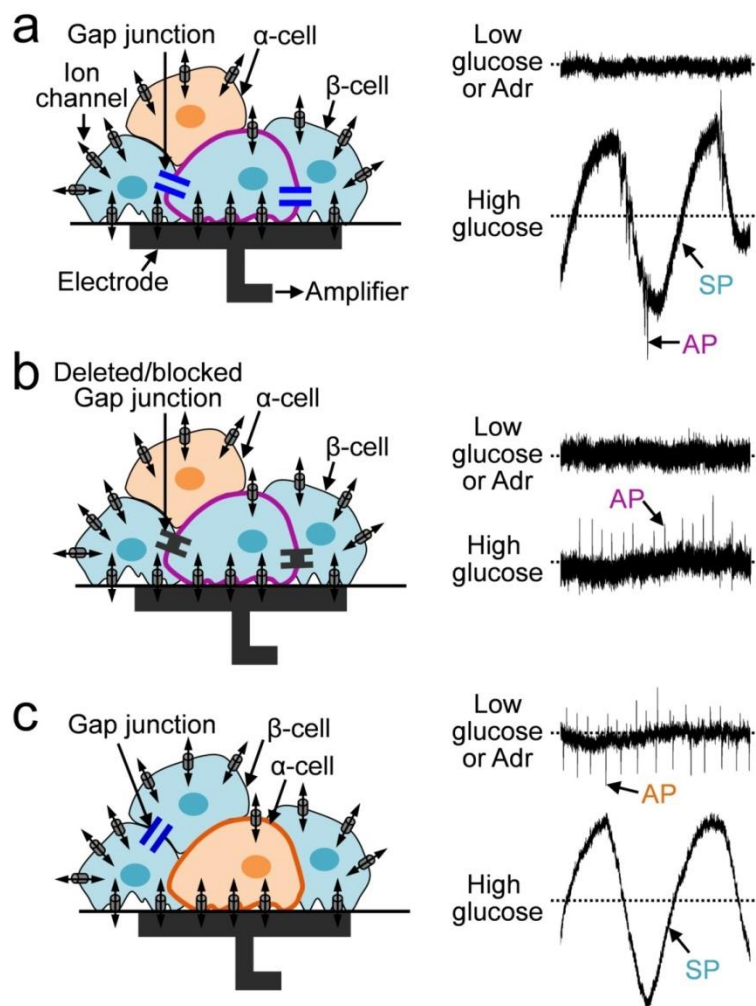
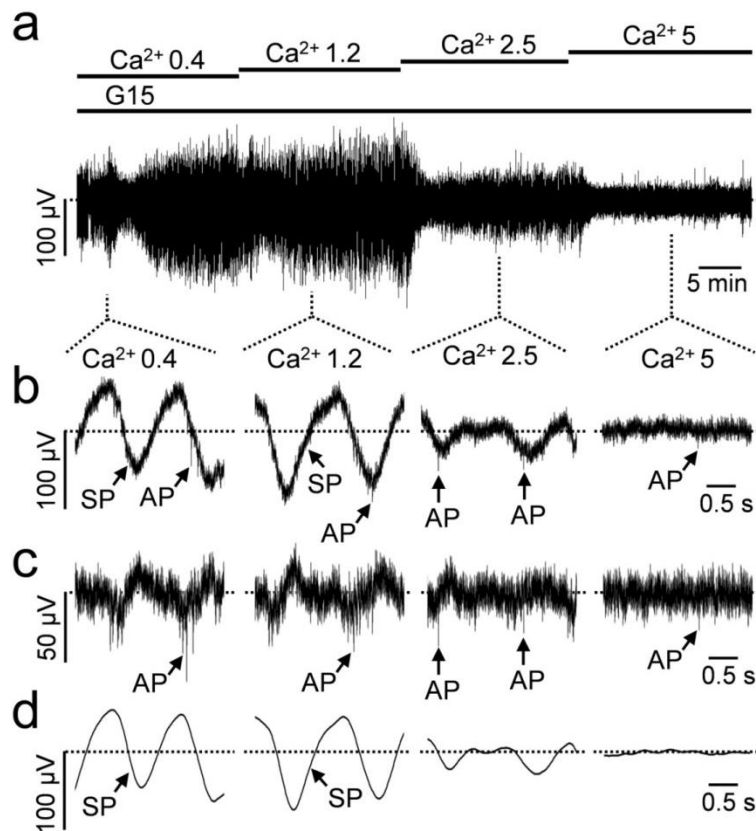


FIG. 6: Slow and action potentials reflect different cell-cell coupling and cell types in islets.

a-c: Schematic representation for one electrode of the array of the different cell configurations (left) that lead to the signal recordings shown on the right. **a:** At low glucose or in the presence of adrenaline (Adr), an islet cell cluster appears silent when only beta-cells (blue) contact the microelectrode. At high glucose, such clusters generate SPs, due to the synchronized activity resulting from beta-cell coupling through Cx36 gap junctions. The SPs are superimposed with individual APs fired by a beta-cell centred on the electrode (circled in purple). **b:** The decrease or suppression of gap junction coupling (either pharmacologically or by invalidation of the Cx36 gene) results in the inhibition of SPs but not single cell APs at elevated glucose. **c:** When an alpha-cell (in orange) is centred on the electrode, it only fires APs in the presence of low glucose or adrenaline. Elevation of the glucose concentration silences alpha-cells, leading to the recording of only SPs generated by beta-cell coupling. In this configuration APs are not observed at elevated glucose due to the long distance of beta-cells from the recording electrode.

SUPPORTING DOCUMENTS/DATA



ESM Supplemental FIG. 1: Glucose-evoked slow potentials are generated at physiological extracellular calcium levels.

a: Representative electrical response of mouse islet cells to increasing extracellular calcium concentrations (indicated in mmol/l) in the presence of 15 mmol/l glucose (G15). **b:** Higher temporal resolution of portions of the recording in **a**. **c** and **d:** Specific band-pass filtering (**c**: 2–700 Hz; **d**: 0.2–2 Hz) shows the decreasing amplitude of SPs for increasing concentrations of extracellular calcium.

Donor number	Age (year)	Sex	BMI (kg/m ²)
1	39	Male	22.2
2	39	Male	22.9
3	36	Female	27.5

ESM Supplemental Table 1: Characteristics of human islet donors.

3. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

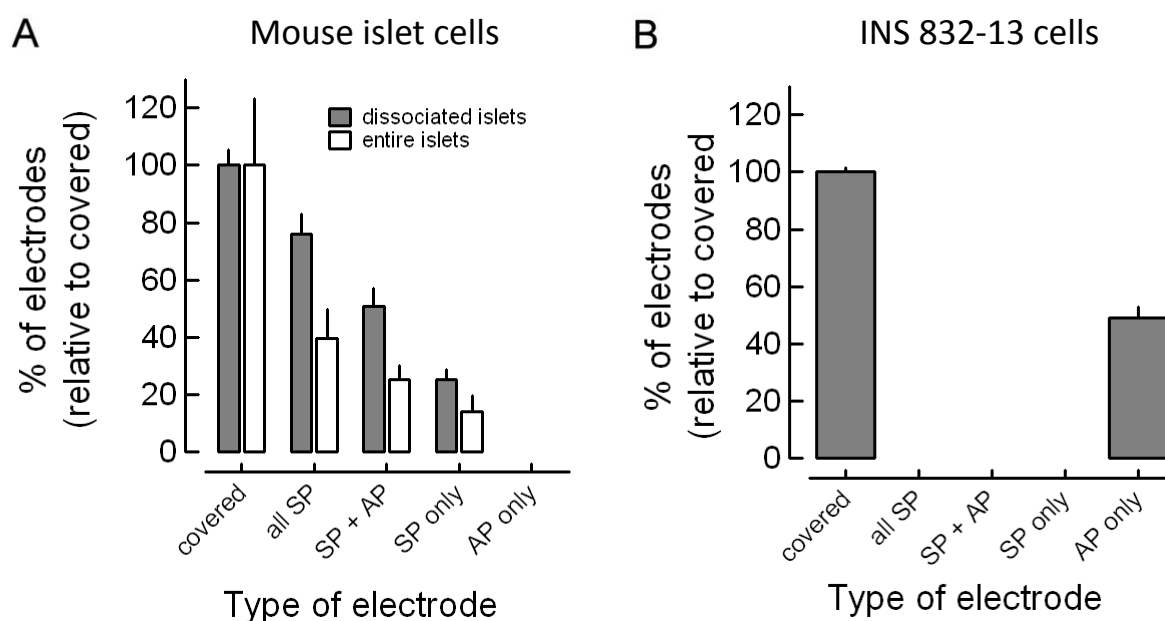


FIG. S1: Repartition of slow potentials and action potentials on recording electrodes

A: Recordings of mouse islet activities (15 mM glucose, 1.2 mM Ca^{2+}) display both slow potentials (SP) and action potentials (AP). SP were observable in more electrodes than AP, and AP were always observed in the presence of SP. **B:** In contrast, in INS 832-13 recordings (15 mM glucose, 2.5 mM Ca^{2+}) only action potentials are visible. Mouse entire islets: N=7 independent experiments, mouse dissociated islets N=13 independent experiments, INS 832-13 N=7 independent experiments. Graphs display percentages relative to the number of electrodes covered \pm SEM.

Dans le cadre de la caractérisation des potentiels lents (*Slow potentials* – SPs) générés par les îlots en réponse au glucose, notamment de la relation entre les SPs et les potentiels d'action (Action Potentials – APs), la question s'est posée de savoir si toutes les électrodes enregistrant des activités présentaient les deux types de signaux. En effet, dans les activités électriques produites par les îlots de souris, les deux types de signaux sont retrouvés, mais ceux-ci ne sont pas forcément observés systématiquement sur toutes les électrodes couvertes par les cellules. Nous avons donc quantifié le nombre d'électrodes présentant chaque type de signal (AP et SP) en rapport avec le nombre d'électrodes couvertes par les cellules. Comme le montre la Fig. S1.A, on peut voir que toutes les électrodes enregistrant une activité dans les îlots de souris comportent des SPs, tandis que les APs ne sont pas observés systématiquement.

Cela s'explique très probablement par le fait que les SPs constituent un signal plus robuste et donc plus facilement détectable que les APs. De plus, à haut glucose, les APs sont toujours observés sur les électrodes présentant des SPs. Notez ici que lors d'enregistrements d'îlots de souris partiellement dissociés, 80% des électrodes couvertes présentent un signal, contre seulement 40% environ dans le cas d'îlots entiers, très certainement en raison d'un contact réduit entre les cellules et les électrodes lors de l'enregistrement d'îlots entiers. Nous avons également quantifié le nombre d'électrodes présentant un signal lors d'enregistrements de cellules clonales INS 832-13, et avons constaté que sur les électrodes potentiellement couvertes par les cellules, seulement 50% environ détectent une activité électrique, celle-ci comportant uniquement des APs et jamais de SPs (*Fig. S1.B*).

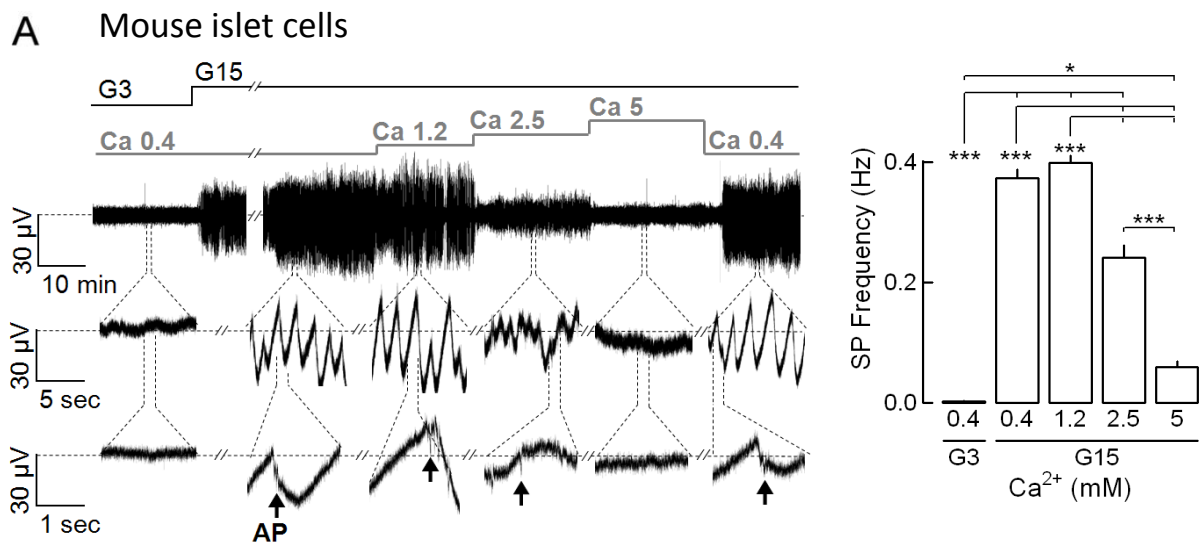


FIG. S2: Calcium sensitivity of electrical signals in mouse islets and clonal cells

A: In mouse islets, SPs are generated for physiological levels of extracellular calcium (Ca) of 1.2 mM and below, but are abolished for increased calcium levels, as illustrated by the representative trace (left) and the quantification of SP frequencies (right). **B:** In contrast, INS 832-13 activity is made of APs only, and AP firing increases when extracellular calcium levels rise. $p < *** .001$, $** .01$, $* .05$.

Une autre façon de discriminer APs et SPs était d'évaluer la réponse des cellules à différentes concentrations extracellulaires de calcium. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale à l'article, les SPs étaient observés chez les îlots de souris dans du milieu de culture à base de RPMI, comprenant 0.4 mM de Ca^{2+} , mais pas dans la solution d'enregistrement classiquement utilisée en électrophysiologie comprenant elle une concentration de calcium plus élevée de 2.5 mM. Nous avons donc émis hypothèse que les SPs pouvaient dépendre de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ et avons enregistré l'activité des cellules d'îlots de souris en réponse à différentes concentrations extracellulaires de Ca^{2+} . Comme le montrent la *Figure ESM S1* de l'article ainsi que la *Fig. S2.A*, les SPs sont effectivement générés pour des niveaux de calcium extracellulaires physiologiques de 1.2 mM ou moins, et sont fortement réduits voir complètement inhibés au-delà. Ainsi, à la concentration de calcium classiquement utilisée (2.5 mM), les SPs sont difficilement observables. Cela se retrouve également au niveau des fréquences des SPs, cependant cette quantification utilisant un seuil de détection pour « compter » les SPs pourrait être biaisée par la diminution d'amplitude des SPs avec l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} , les SPs n'étant alors plus suffisamment amples pour franchir le seuil de détection. Étant donné que, dans les îlots de souris, les SPs dépendent de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, nous avons voulu savoir si l'absence de SPs dans les enregistrements des cellules clonales INS 832-13 était également due à une concentration de Ca^{2+} extracellulaire trop élevée. Comme le montre la *Fig. S2.B*, chez les INS 832-13, quelle que soit la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, aucun SP n'est généré, et seuls des APs sont observés, ceux-ci augmentant en fréquence et en amplitude avec la $[\text{Ca}^{2+}]_o$.

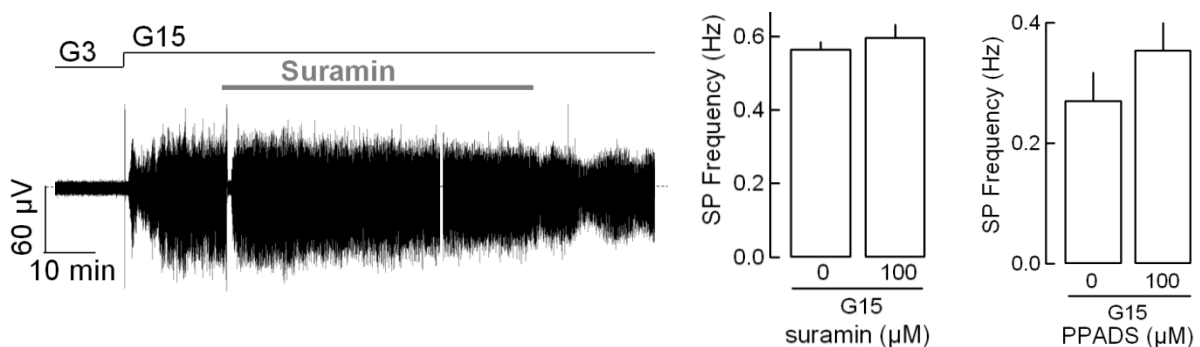


FIG. S3: Purinergic signalisation is not involved in slow potential generation

Representative trace (left) of recorded activities from mouse islet cells, showing that the purinergic receptor antagonist suramin does not influence SP generation. SP frequencies were altered neither by suramin application (100 μM, middle) nor by PPADS, another ATP receptor inhibitor (100 μM, right).

Dans le cadre de la caractérisation des SPs, nous avons cherché à savoir si ceux-ci résultaient d'une signalisation autocrine purinergique. Comme le montre la *Figure S3*, deux antagonistes des récepteurs purinergiques, la suramine et le pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS), n'ont eu aucun effet sur la génération des SPs, que ce soit au niveau de l'amplitude (comme le montre la trace représentative de l'activité de cellules d'îlots de souris en présence de 15 mM de glucose et 100 μ M de suramine) ou de la fréquence des SPs.

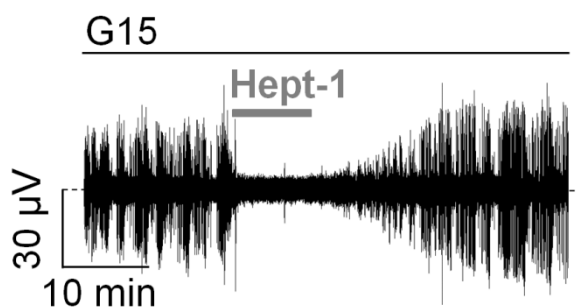


FIG. S4: Slow potentials depend on gap junctional coupling between β -cells.

Representative trace showing SP inhibition upon application of the gap junctional blocker heptanol-1 (3.5 mM).

En revanche, les bloqueurs de jonctions communicantes ont aboli les SPs, comme indiqué dans la *Fig. 4* de l'article, ainsi que la *Figure S4* montrant une trace représentative de l'effet inhibiteur de l'heptanol-1 sur les SPs, suggérant une implication centrale du couplage entre cellules β par les jonctions communicantes dans la génération des SPs, ce qui a été confirmé par l'absence de SPs dans l'activité d'îlots de souris invalidées pour la connexine 36 spécifiquement dans les cellules β (*Fig. 4* de l'article).

Dans le cadre du développement d'un capteur hybride bioélectronique destiné à évaluer la qualité des îlots avant transplantation, et à plus long terme à être utilisé comme capteur implantable de la demande en insuline chez les diabétiques, il est important de savoir si les signaux enregistrés par MEA sont exploitables de façon automatisée. Nos collaborateurs en microélectronique (équipe de Sylvie Renaud, Electronics Interfacing Biology, institut de l'Intégration du Matériau au Système, UMR CNRS 5218) ont développé une carte d'analyse en temps réel capable de détecter les APs générés en réponse au glucose par des cellules d'îlots de souris ou des cellules β clonales sur les MEAs. Ce prototype (Nguyen *et al.* 2013), est en constante amélioration par l'ajout de nouvelles fonctions d'analyse. Celles-ci sont auparavant conçues sous forme d'algorithmes MATLAB testés en *offline*, pour validation, sur

des signaux d'îlots de souris préenregistrés. Si ces algorithmes sont performants, ils sont ensuite implémentés sur la carte microélectronique. Celle-ci peut actuellement isoler les APs du reste du signal, les détecter et en calculer la fréquence instantanée en temps réel. Des algorithmes ont également été conçus pour le calcul de la FOPP, et les algorithmes pour l'analyse des SPs (fréquences, amplitudes) en temps réel sont en cours de validation. En parallèle, nos collaborateurs développent également des fonctions donnant en sortie une indication sur l'état métabolique des îlots, calculée à partir des résultats multiparamétriques (fréquence instantanée et FOPP pour les APs, amplitude et fréquence pour les SPs, *cf.* Figure S5).

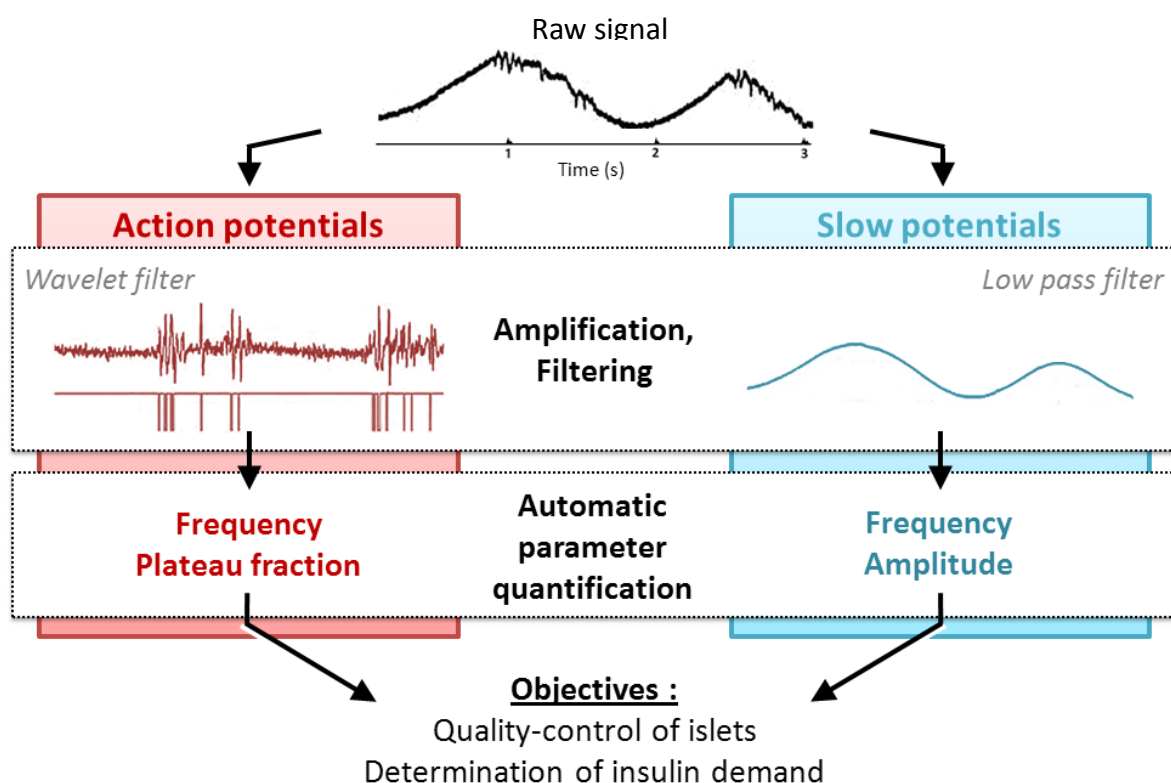


FIG. S5 : Example of signal processing using customized algorithms

Raw signals recorded from islets using MEA are amplified and filtered in order to isolate the pertinent information provided by action potentials and slow potentials from the background noise. Specific parameters are then extracted from these two signals: the instantaneous frequency and plateau fraction (FOPP) of action potentials on one hand, and mean frequencies and amplitudes of slow potentials on the other hand are calculated. An additional algorithm is under development to perform a multiparametric analysis based on the parameters calculated from APs and SPs, with the final aim to use these signals for the quality control of islets to be transplanted, and for the evaluation of insulin demand in diabetic patients in the context of an implanted biosensor.

Le *tableau S1* montre les résultats obtenus avec un algorithme qui classe automatiquement des échantillons d'enregistrements à partir des fréquences instantanées calculés sur les APs. Ces résultats montrent que le classement établi par le programme (colonne « Blind ranking ») suit l'ordre croissant des concentrations de glucose qui ont été appliquées durant l'enregistrement des signaux analysés (colonne « Glucose concentrations »). Le programme est capable d'ainsi classer à l'aveugle et de façon automatique des échantillons pour une complexité allant jusqu'à 5 différentes concentrations de glucose.

Complexity	Blind ranking	Glucose concentrations (mM)
2 Glucose concentrations	1 st	3
	2 nd	15
	1 st	3
	2 nd	15
3 Glucose concentrations	1 st	3
	2 nd	6
	3 rd	15
5 Glucose concentrations	1 st	3
	2 nd	5.5
	3 rd	8.2
	4 th	11
	5 th	15

Table S1: Blind ranking of recordings (AP) at different glucose concentrations.

SECONDE ÉTUDE :

GLUK2 ET VIEILLISSEMENT :

RÔLE DE L'AUTORÉGULATION DE LA

CELLULE α DANS LA PERTE DE FONCTION

DES ÎLOTS DE LANGERHANS

1. INTRODUCTION : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Parallèlement à la caractérisation des *slow potentials*, la question se posait s'il était possible d'utiliser l'enregistrement de l'activité des îlots par MEA pour le phénotypage électrophysiologique d'îlots de souris invalidées pour des gènes d'intérêt. Dans cette optique, nous avons mis en place une collaboration avec le groupe du Dr. Christophe Mulle (Physiologie des synapses glutamatergiques, Institut des Maladies Neurodégénérative, UMR CNRS 5297), spécialisé dans les mécanismes de la transmission synaptique glutamatergique, et possédant une large collection de souris transgéniques.

Les cellules β des îlots de Langerhans sont des cellules endocrines qui possèdent de nombreuses similitudes avec les cellules neuronales, comme par exemple l'expression des protéines SNARE nécessaires à l'exocytose (Sudhof & Rothman 2009, Sudhof 2013), les protéines d'adhésion synaptique comme la neuroligine et la neurexine (Suckow *et al.* 2008, Mosedale *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2013), ou encore de la latrophiline, le récepteur de l' α -latrotoxine (Lang *et al.* 1998, Sudhof 2001). De même, de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs sont retrouvés dans les îlots (Satin & Kinard 1998).

Nous avons donc étudié en détail la liste des souris transgéniques disponibles et, suite à une recherche bibliographique, notre choix s'est porté sur les souris invalidées pour la neuroligine 1 (NL1) ou les récepteurs ionotropiques au glutamate de type kaïnate 2 (GluK2) ou 3 (GluK3). En effet, il a été montré que ces différentes protéines sont exprimées dans les îlots de Langerhans, cependant leur fonction précise reste peu ou pas connue.

Les expériences préliminaires menées sur les îlots de souris invalidées pour la NL1 n'ont pas montré de résultats significativement différents par rapport aux îlots de souris contrôles. Les expériences comparant la sensibilité au glucose des *slow potentials* dans les îlots de souris invalidées pour GluK3 et dans les îlots de souris sauvages n'ont pas non plus révélé de différences entre les deux génotypes. Nous avons donc décidé de concentrer nos expériences sur les animaux invalidés pour GluK2.

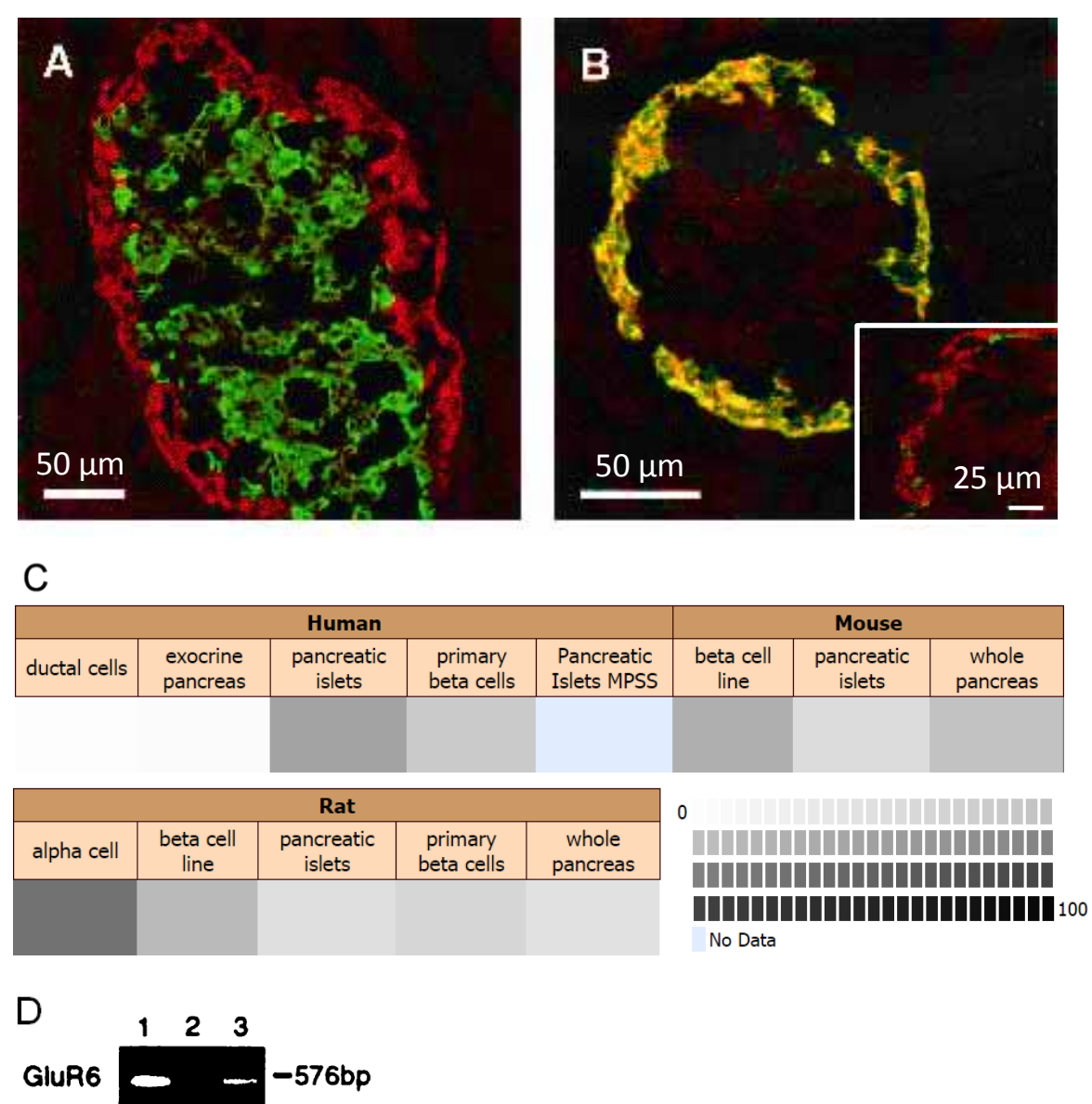


Fig 1 : Expression de la sous-unité GluK2 dans les îlots de Langerhans

A et **B**: Clichés confocaux de sections de pancréas de rat montrant des îlots marqués pour **A**: les récepteurs GluK2/3 et l'insuline; **B**: les récepteurs GluK2/3 et le glucagon; encadré: les récepteurs GluK2/3 et la somatostatine. Les récepteurs glutamatergiques sont marqués en rouge et les hormones en vert. **C**: Profil d'expression de la sous-unité GluK2 dans les tissus pancréatiques établi à partir d'études micro array (T1Dbase). **D**: Analyse RT-PCR de l'expression des ARNm de la sous-unité GluK2 (GluR6) dans les tissus cérébraux de rat (1), la lignée clonale de cellules insulinosécrétrices de rat RINm5F (2) et les îlots pancréatiques de rat (3). La taille attendue de chaque produit de PCR est indiquée à droite. **A** et **B** d'après Weaver et al. (1996), **C** d'après http://www.t1dbase.org/page/Overview/display/gene_id/2898, **D** d'après Inagaki et al. (1995).

La sous-unité GluK2 des récepteurs ionotropiques au glutamate, également nommée GluR6, a été montrée comme étant exprimée dans les îlots de Langerhans. En effet, le transcrit du gène codant pour GluK2 a été détecté dans les îlots pancréatiques de rat (Inagaki *et al.* 1995). Des études de marquages immunohistochimiques menés sur des îlots de rat ont montré une co-localisation du marquage anti-GluK2 avec le marquage anti-glucagon, mais pas avec les marquages anti-insuline ou anti-somatostatine (*Fig 1*), révélant une expression protéique de GluK2 dans les cellules α (Weaver *et al.* 1996).

Il a été montré que le glutamate stimule la sécrétion de glucagon par la cellule α (Bertrand *et al.* 1993). En effet, le glutamate est co-relargué avec le glucagon par les cellules α et agit comme un signal paracrine via des récepteurs glutamatergiques ionotropiques (iGluR) pour potentialiser la sécrétion de glucagon. L'action instantanée de ce mécanisme sur les cellules α a été bien décrit (Cabrera *et al.* 2008), mais ses effets à plus long terme sur la fonction des îlots, en particulier sur les cellules β insulinosécrétrices, restent à être caractérisés. Cette caractérisation est d'autant plus nécessaire si l'on prend en compte la diminution de la libération d'insuline qui est observée avec l'âge (Iozzo *et al.* 1999), et qui s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de glucagon (Stumvoll *et al.* 1998). De plus, il a été montré que la sécrétion d'insuline est d'autant plus diminuée, et la sécrétion de glucagon d'autant plus augmentée, dans les cas de diabète (Geloneze *et al.* 2014). En raison de l'augmentation constante de l'espérance de vie et de la prévalence du diabète dans le monde (Wild *et al.* 2004), les effets de l'âge sur la fonction des îlots, qui jusqu'à présent ont été peu étudiés, constituent une question cruciale.

Étant donné que la cellule α s'autostimule par un mécanisme autocrine impliquant le glutamate, celui-ci pourrait être exacerbé au cours du vieillissement et être responsable de l'augmentation de la sécrétion de glucagon observée chez les individus âgés. De plus, en raison des régulations paracrines existant au sein de l'îlot, la cellule α sur-stimulée pourrait alors être responsable, par voie paracrine, de la diminution de la sécrétion d'insuline observée au cours du vieillissement.

L'effet du glutamate par les cellules α implique des iGluR de type AMPA et Kainate. Parmi les iGluR de type Kainate, la sous-unité la plus détectée dans les cellules α est la sous-unité GluK2 (Cabrera *et al.* 2008). Nous avons supposé que chez des animaux génétiquement invalidés pour la sous-unité GluK2 (Mulle *et al.* 1998), l'autostimulation de la cellule α par le

glutamate devrait être en partie altérée. Si ce mécanisme s'avère être sur-stimulé au cours du vieillissement comme nous le supposons, les animaux GluK2^{-/-} devraient être en partie protégés des effets du vieillissement sur la fonction insulaire.

Nous avons donc entrepris de déterminer quels étaient les effets du vieillissement sur la fonction des îlots chez les souris sauvages et les souris GluK2^{-/-}. Cette seconde étude, dont les résultats préliminaires sont ici présentés, exploite le signal « *slow potentials* » pour évaluer la sensibilité au glucose des îlots provenant de souris des deux génotypes à deux âges différents : des jeunes adultes (~10 semaines) et des adultes d'âge moyen (~40 semaines). Ces expériences *in vitro* ont été accompagnées d'expérimentations *in vivo* afin d'évaluer la réponse au glucose dans un contexte plus physiologique.

Pour la conduite de ce deuxième projet, j'ai soumis une demande de quatrième année de thèse à la FRM qui n'a pas été accordée.

2. MÉTHODES

Animaux :

Des souris mâles de 10, 14 semaines (groupe jeunes adultes) et de 40 semaines (groupe adultes d'âge moyen) invalidées pour la sous-unité GluK2, homozygotes (GluK2^{-/-}), ont été utilisés dans cette étude. Les congénères sauvages issus de la même lignée (GluK2^{+/+}) ont été sélectionnés aux mêmes âges pour servir de contrôles. Ces animaux ont été généreusement fournis par le Dr. Christophe Mulle (Physiologie des synapses glutamatergiques, Institut des Maladies Neurodégénérative, UMR CNRS 5297).

Expériences *in vitro* :

L'isolation et la mise en culture des îlots de Langerhans sur les MEAs, les enregistrements des activités électriques des îlots ainsi que l'analyse *off-line* et la quantification des *slow potentials* ont été effectués selon les procédures décrites dans le manuscrit de la première étude de cette thèse. Les fréquences des *slow potentials* ont été moyennées pour le nombre total d'électrodes, et rapportées à la fréquence obtenue à la concentration maximale de glucose.

Expériences *in vivo* : tests de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale :

Les tests de tolérance au glucose ont été conduits sur des souris GluK2^{+/+} et GluK2^{-/-} de 14 semaines (*Fig 2*) mis à jeun 6 heures avant une injection intrapéritonéale de 2 g/kg de glucose (IPGTT). Des échantillons de sang ont été prélevés à la veine caudale avant (temps 0 minute) et à 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 150 minutes après l'administration de glucose pour mesurer la concentration sanguine de glucose (lecteur de glycémie FreeStyle PAPILLON InsuLinx, Abbott Diabetes Care, Alameda, California, USA).

Statistiques :

Les résultats présentent la moyenne (mean) \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM) pour un nombre N d'électrodes (enregistrement MEA) ou d'animaux (IPGTT). En raison d'un nombre insuffisant d'animaux compris dans la quantification, aucune analyse statistique n'a été appliquée aux résultats des enregistrements électrophysiologiques. Un test *t* de Student bilatéral a été utilisé pour comparer la glycémie entre les deux génotypes à chaque temps de mesure de l'IPGTT.

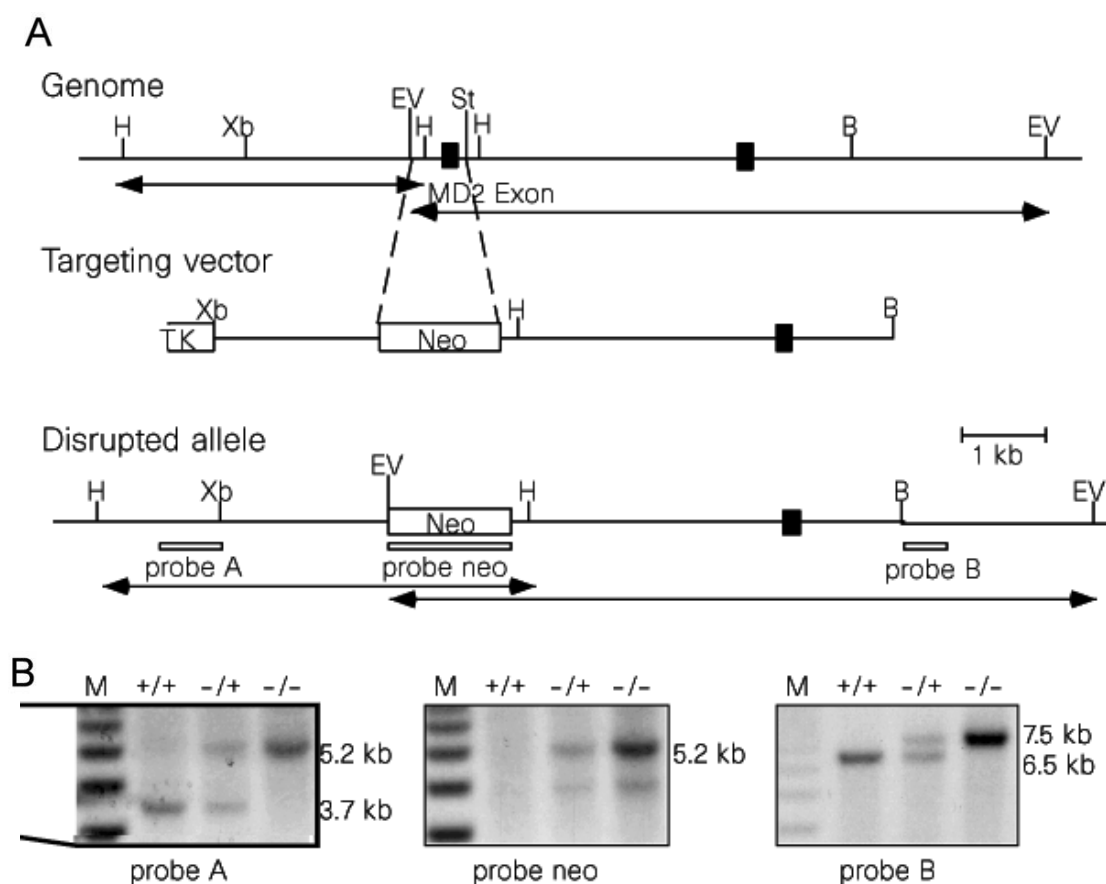


Fig 2 : Suppression de l'expression du gène codant pour GluK2 par recombinaison homologue

A: La ligne supérieure montre la structure de la région génomique du gène *Grik2* autour de l'exon codant pour le second domaine membranaire (MD2). Sur la ligne du milieu, le vecteur recombinant contient 2.0 kb et 4.7 kb d'ADN homologue en 5' et 3' respectivement, et porte une délétion de 0.7 kb incluant l'exon codant pour MD2. La ligne inférieure montre la structure génomique de l'allèle mutant généré par recombinaison homologue. Les séquences utilisées comme sondes dans les analyses Southern blot sont indiquées, ainsi que les sites de clivage par les enzymes de restriction (H, *Hin* dIII; Xb, *Xba* I; EV, *Eco* RV; St, *Stu* I; B, *Bam* HI). **B:** Analyses en Southern blot de l'ADN génomique extrait à partir de biopsies de queue de souris sauvages (+/+), mutantes hétérozygotes (-/+) et mutantes homozygotes (-/-). Ces résultats ont été obtenus en utilisant les sondes A ou neo sur des ADN digérés par *Hin* dIII, et par la sonde B sur des ADN digérés par *Eco* RV. D'après Mulle et al. (1998).

3. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Afin d'évaluer les effets du vieillissement sur la fonction des îlots, les activités électriques d'îlots de souris de deux âges différents ont été enregistrées par MEA : des souris jeunes adultes (~10 semaines) et des souris d'âge moyen (~40 semaines). Des souris invalidées pour la sous-unité GluK2 des récepteurs ionotropiques au glutamate (GluK2^{-/-}), chez lesquelles la boucle d'autostimulation de la cellule α impliquant le glutamate est potentiellement perturbée, ont été utilisées afin de voir si les effets du vieillissement sur la fonction des îlots étaient différents chez ces animaux. Notre première hypothèse était que l'absence de l'autostimulation de la cellule α chez les animaux GluK2^{-/-} jeunes devrait reproduire un phénotype d'animaux âgés en raison de signalisations paracrines réduites.

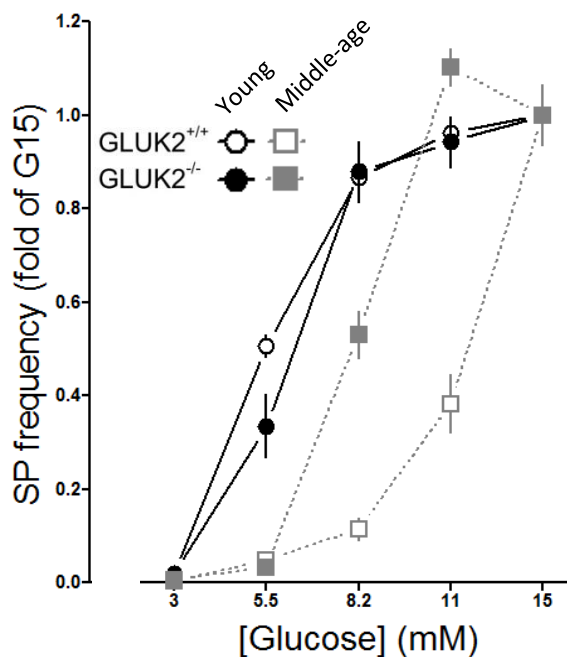


Fig 3: Islets from middle aged GluK2-deficient mice tend to have a better sensitivity to glucose than islets from age-matched wildtype mice.

While no difference in SP frequencies is observed between islets from young (10 weeks) mice of both genotypes, islet cells from middle-aged (40 weeks) wildtype mice display a marked decrease in SP frequencies. In contrast, SP frequencies in islets from age-matched GluK2^{-/-} mice are decreased to a lesser extent than those of WT. Results are mean \pm SEM. N=15-79 electrodes per group, 1 young mouse GluK2^{+/+} \circ , 2 young mice GluK2^{-/-} \bullet , 2 middle-aged mice GluK2^{+/+} \square , 2 middle-aged mice GluK2^{-/-} \blacksquare . Experiments were conducted in perfused media, each glucose concentration being applied for 15-20 minutes.

La sensibilité des îlots provenant de souris des deux génotypes aux deux âges indiqués a été évaluée *in vitro*. Pour cela, la dose-dépendance des *slow potentials* au glucose a été mesurée. De façon surprenante, comme le montre la Fig 3, les îlots de souris jeunes présentent globalement la même sensibilité au glucose pour les deux génotypes. Concernant les animaux

GluK2^{+/+}, on peut voir que la sensibilité des îlots diminue fortement avec l'âge, étant donné que les îlots issus de souris GluK2^{+/+} d'âge moyen génèrent des *slow potentials* de fréquences beaucoup plus faibles pour une même concentration de glucose que les îlots issus de souris GluK2^{+/+} jeunes. Au contraire, les îlots de souris GluK2^{-/-} d'âge moyen conservent une meilleure sensibilité au glucose, avec un profil de réponse intermédiaire entre celui des îlots GluK2^{+/+} jeunes et GluK2^{+/+} âgés. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confirmés en reproduisant cette expérience sur des animaux supplémentaires, toutefois, ils suggèrent que GluK2 pourrait jouer un rôle dans la perte de sensibilité au glucose, et donc de fonction, liée à l'âge observée chez les îlots contrôles.

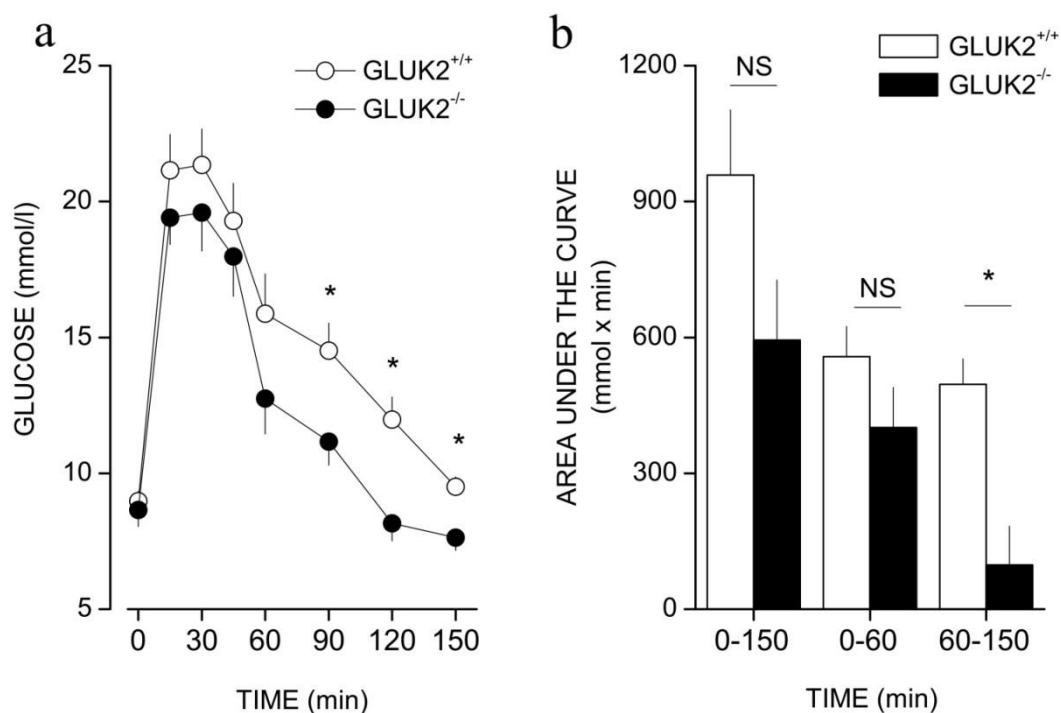


Fig 4: 14 weeks-old GluK2 deficient mice have a significantly better glucose tolerance than age-matched wild-type animals.

a: Blood glucose levels decrease more rapidly after an intraperitoneal glucose challenge in mice lacking the GluK2 subunit than in control mice. **b** shows areas under the curves calculated from **a**. Mean \pm SEM, N=10 animals per genotype. $2p < .05$ (two-tailed Student's t-test).

Dans l'idée de voir si cette perte de sensibilité des îlots liée à l'âge a des conséquences fonctionnelles sur l'homéostasie glucidique, des tests de tolérance au glucose *in vivo* ont été programmés sur des animaux des deux génotypes aux mêmes âges que ceux étudiés lors des

tests *in vitro*. Les premiers résultats obtenus chez les animaux jeunes (14 semaines) montrent que dès cet âge, les souris GluK2^{-/-} présentent une meilleure tolérance au glucose que leur congénères sauvages (GluK2^{+/+}), leur glycémie revenant plus vite à la normale après une injection intrapéritonéale de glucose (*Fig 4*).

Les tests de tolérance au glucose à venir sur les animaux âgés de 45 semaines permettront de déterminer si cet écart entre les deux génotypes s'accroît avec l'âge.

DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de caractériser une nouvelle signature électrophysiologique de l'activité syncytiale des îlots de Langerhans, nommée *slow potential*, qui joue un rôle important dans l'homéostasie glucidique. Les signaux ainsi caractérisés ont pu ensuite être utilisés au cours d'une étude préliminaire pour différencier le comportement électrophysiologique d'îlots issus d'animaux génétiquement différents.

1. LES SLOW POTENTIALS

1.1. Discussion des résultats

Comme cela a déjà été abordé dans la partie discussion du manuscrit, les *slow potentials* représentent un signal électrique spécifique des cellules β et dépendent du couplage intercellulaire de celles-ci via les jonctions communicantes. Il s'agit d'un signal multicellulaire assimilable aux potentiels de champs locaux générés par des populations neuronales. Les potentiels d'action résultent au contraire de l'activité unitaire des cellules endocrines, et peuvent être générés aussi bien par des cellules β que par les cellules α (ainsi que les δ , cette dernière population de cellule étant néanmoins trop peu représentée dans l'îlot pour être significativement enregistrée lors de nos expériences).

Tandis que les potentiels d'action sont des signaux bien connus de l'activité des cellules β , les *slow potentials* sont ici observés et caractérisés pour la première fois. Des oscillations similaires avaient déjà été observées auparavant par Palti *et al.* (1996) mais n'avaient pas été caractérisées. Nous montrons ici que les *slow potentials* constituent un signal bien plus ample et robuste que les potentiels d'action, et sont donc détectés plus facilement. Ils sont générés en réponse au glucose et à des secrétagogues connus (tels que les sulfonylurées) pour des concentrations physiologiques de calcium extracellulaire, ce qui peut expliquer pourquoi ces signaux ne sont pas observés dans la plupart des études électrophysiologiques utilisant des concentrations calciques plus élevées. L'inefficacité d'une stimulation KCl à induire des *slow potentials*, qui sont stimulés par le glybenclamide, indique que la fermeture du canal K_{ATP} est nécessaire dans ce signal.

Les *slow potentials* reflètent le couplage fonctionnel des cellules β par les jonctions communicantes. Il a été montré que la connexine 36, sous-unité des jonctions communicantes

exprimée par la cellule β (Serre-Beinier *et al.* 2000, Moreno *et al.* 2005, Serre-Beinier *et al.* 2009), joue un rôle crucial dans la fonction des îlots de Langerhans, en synchronisant l'activité électrique, les oscillations calciques intracellulaires et les vagues calciques intercellulaires entre les cellules β au sein de l'îlot (Calabrese *et al.* 2001, Bosco *et al.* 2011, Perez-Armendariz 2013). En effet, plusieurs études ont montré que le couplage par la connexine 36 augmente considérablement la sécrétion d'insuline en synchronisant les cellules β au sein de l'îlot (Charollais *et al.* 2000, Le Gurun *et al.* 2003, Speier *et al.* 2007) et protège la cellule β contre l'apoptose (Klee *et al.* 2011). D'autre part, il a été montré que le couplage entre cellules β impliquant la connexine 36 est altéré chez la souris pré-diabétique (Carvalho *et al.* 2012), et la perte partielle (Wellershaus *et al.* 2008) ou totale (Ravier *et al.* 2005) de l'expression de la connexine 36 diminue fortement la sécrétion d'insuline. De plus, il apparaît que l'expression de la connexine 36 change pendant la maturation des cellules β au cours du développement (Carvalho *et al.* 2009). Tous ces résultats indiquent que les *slow potentials*, qui dépendent du couplage par les connexines 36, constituent un excellent marqueur non seulement de la fonction normale des îlots, mais également de la maturation et de la survie cellulaire des cellules β .

En outre, la sensibilité au glucose des *slow potentials* ainsi que leur suppression en présence de la nifédipine, un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants de type L nécessaires au déclenchement de l'exocytose des granules d'insuline, indiquent que les *slow potentials* sont liés de façon opérationnelle à la sécrétion d'insuline. De plus, les effets observés du glucose ainsi que des hormones GLP-1 et adrénaline sur les fréquences des *slow potentials* au cours de cette étude sont en accord avec l'action connue de ces facteurs sur la sécrétion d'insuline. Cette étude présente également l'application de l'approche MEA à l'enregistrement des îlots humains, montrant que ceux-ci présentent des signaux électrophysiologiques similaires à ceux générés par les îlots de souris, comprenant à la fois des potentiels d'action et des *slow potentials*, et ceci en dépit des différences d'expression des canaux ioniques existant entre les deux espèces. De plus, les signaux électriques générés par les îlots humains ont pu être enregistrés pendant 24 heures en continu, montrant une stabilité des *slow potentials* pendant toute la durée d'enregistrement.

Nos données montrent que la fréquence des *slow potentials* est finement corrélée aux concentrations ambiantes de glucose et de GLP-1, celui-ci ayant des effets à des concentrations picomolaires similaires aux niveaux circulants de l'hormone mesurés *in vivo* pendant la

période postprandiale. Les fréquences des *slow potentials* varient de façon instantanée aux changements ambiants de glucose et de GLP-1, démontrant que la fonction des cellules β peut être évaluée en temps réel et ne nécessite pas des durées aussi longues que celles utilisées pour la quantification des FOPP. Des études ont en effet présenté des calculs de FOPP nécessitant une vingtaine de minutes (Pfeiffer *et al.* 2011). Cela est d'autant plus vrai dans les îlots humains dans lesquels l'activité en bouffées est moins marquée que chez les rongeurs. La demande en insuline serait donc encodée au niveau de l'îlot par la fréquence globale des *slow potentials* générés suite à l'intégration des multiples signaux nutritionnels et hormonaux.

Enfin, l'un des résultats les plus intéressants de cette étude est la différence d'effet du glucose sur les *slow potentials* pendant l'augmentation et la diminution progressives des concentrations de glucose. Les dose-dépendances des fréquences des *slow potentials* se présentent en effet sous la forme d'une hystérèse, similaire à celle déjà retrouvée pour les taux circulants de peptide C mesurés chez l'Homme (Keenan *et al.* 2012). Cette réponse particulière reflète une grande réactivité des îlots lors d'une augmentation de glucose, et une diminution de la sensibilité des signaux spécifiquement β lors de la diminution du glucose, qui représente très probablement un mécanisme de protection contre l'hypoglycémie en prévenant une libération continue d'insuline. Ce phénomène étant retrouvé dans les îlots isolés, ce mécanisme de protection est encodé au niveau même du micro-organe et fonctionne probablement indépendamment de régulations extérieures à l'îlot.

Ce travail a donc identifié les *slow potentials* comme un nouveau biomarqueur pour l'étude rapide et non-invasive d'îlots isolés. Ces « ondes de couplage » des cellules β constituent un signal robuste qui ne nécessite pas de traitements complexes pour être analysés. Ils pourraient de plus être un marqueur approprié pour le contrôle-qualité d'îlots ou de cellules insulinosécrétrices avant transplantation, ou encore au suivi en temps réel de la différenciation de cellules souches. Les variations instantanées de la fréquence des *slow potentials* en réponse au glucose pourrait également permettre de grandement améliorer les algorithmes utilisés dans les appareils de suivi continu de la glycémie et ainsi permettre de fermer la boucle de contrôle dans le cadre d'un pancréas artificiel pour l'insulinothérapie.

Nous montrons également que les enregistrements extracellulaires de l'activité des îlots de Langerhans constituent une approche pertinente pour développer un capteur de la demande en insuline, puisqu'il est possible grâce aux MEAs de détecter des signaux aussi petits

que les potentiels d'action. Cette détection peut se faire en temps réel à l'aide d'un système microélectronique développé par nos collaborateurs (Bornat *et al.* 2010, Raoux *et al.* 2011, Quotb *et al.* 2012, Raoux *et al.* 2012, Nguyen *et al.* 2013). Et nous montrons ici qu'il est possible, à l'aide d'algorithmes dédiés, de déterminer automatiquement à l'aveugle quels sont les niveaux de glucose ambiants à partir des paramètres calculés sur les potentiels d'action. Le fait que cette analyse soit possible avec les seuls potentiels d'action démontre la puissance de notre méthode d'évaluation de l'activité des îlots par MEA. En raison de la robustesse et de la sensibilité au glucose et aux hormones des *slow potentials*, leur intégration dans ce calcul augmentera encore l'efficacité de l'algorithme, qui sera appliqué dans le développement d'un capteur hybride bioélectronique pour la détermination de la demande en insuline.

1.2. Perspectives

Cette première caractérisation des *slow potentials* a permis d'en déterminer l'origine syncytiale ainsi que leur importance physiologique. Les connaissances acquises sur ce nouveau signal peuvent néanmoins être approfondies par des expériences complémentaires.

Nous avons vu que les *slow potentials* constituent un signal stable de la stimulation des cellules β par le glucose ambiant, et peuvent être enregistrés sur plusieurs heures. Leur étude pourra donc être appliquée à l'étude de biorythmes comme par exemple les variations circadiennes de la fonction des îlots grâce à des enregistrements long-terme de l'activité électrique et l'étude de la variation des ondes lentes au cours du temps.

Depuis la découverte d'une activité électrique générée par les îlots par Dean et Matthews (1968), la réponse électrique des cellules β a été intensivement étudiée. Il a été montré que l'organisation des potentiels d'action en bouffées superposées à un plateau de dépolarisation (phases actives) et séparées par des phases électriquement silencieuses était corrélée avec la sécrétion d'insuline (Meissner & Schmelz 1974, Ozawa & Sand 1986, Miura & Pernarowski 1995). Nous montrons ici que les *slow potentials* sont finement corrélés avec la concentration extracellulaire de glucose ainsi qu'avec les niveaux ambiants de GLP-1. Les deux signaux revêtent donc un caractère important vis-à-vis du fonctionnement des îlots. Notre étude soulève la question suivante : lequel, de l'organisation des potentiels d'action en bouffées ou des *slow potentials*, reflète le mieux l'état d'activité des îlots ? La réponse à cette

interrogation est importante pour mieux comprendre la physiologie des îlots, mais également dans l'optique du développement d'un biocapteur basé sur l'enregistrement extracellulaire de l'activité des îlots.

Nous avons montré que les *slow potentials* sont opérationnellement liés à l'exocytose des granules d'insuline en raison de leur dépendance envers l'activité des canaux calciques voltage-dépendants de type L. Cependant les relations entre les *slow potentials* et la sécrétion d'insuline n'ont pas directement été établies expérimentalement en simultané au cours de l'étude présentée dans cette thèse. La sécrétion de cellules ou clusters de cellules isolés pourrait donc être évaluée en temps réel, par exemple en utilisant une approche optique (Dyachok *et al.* 2008). L'enregistrement simultané de l'activité électrique de ces cellules par MEA permettrait alors de corrélérer les signaux électriques des îlots à leur réponse sécrétoire.

Il serait également souhaitable de trouver plus de substances pharmacologiques qui découplent les *slow potentials* des potentiels d'action. Cela permettrait de distinguer l'importance relative de l'activité en potentiels d'action de l'activité en *slow potentials* dans la réponse sécrétoire. Nous avons pu observer un tel découplage entre les *slow potentials* et les potentiels d'action lors du blocage ou de la suppression des jonctions communicantes, ou en faisant varier les concentrations extracellulaires de calcium. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la carbenoxolone sur la sécrétion d'insuline dans les îlots de souris. Cependant, ce bloqueur des jonctions communicantes est assez peu spécifique et agit également sur d'autres cibles moléculaires de la cellule telles que les récepteurs purinergiques (Juszczak & Swiergiel 2009). Il sera alors difficile de différencier son action de blocage sur le couplage de l'effet inhibiteur sur les récepteurs purinergiques dans la réponse sécrétoire finale mesurée. En revanche, les îlots de souris $Cx36^{\text{Flox(CFP)/Flox(CFP)}}$ et $Cx36^{\text{Flox(CFP)/Flox(CFP)}:\text{RIP-Cre}}$ constituent un bien meilleur modèle. Nous avons montré dans notre étude que ces îlots génèrent des potentiels d'action mais pas de *slow potentials* et il a été montré que la sécrétion d'insuline des îlots issus de ces animaux était réduite (Wellershaus *et al.* 2008). Cela indique que les *slow potentials* ont une signification physiologique importante vis-à-vis de la sécrétion d'insuline. Une autre approche serait de faire des mesures de la sécrétion d'insuline par les îlots de souris en incubation statique permettraient d'évaluer la réponse sécrétoire des îlots pour différentes concentrations de calcium extracellulaires. L'idée est de déterminer si la sécrétion d'insuline est diminuée pour des taux supraphysiologiques de calcium (2.5 et 5 mM) comme c'est le cas

pour les *slow potentials*. Si tel est le cas, cela apportera une évidence supplémentaire de l'importance du signal *slow potentials* dans la réponse sécrétoire des îlots.

L'hystérèse de la réponse au glucose des îlots n'avait jamais été décrite auparavant *in vitro*. Une étude a reporté l'existence de ce phénomène *in vivo* chez l'Homme (Keenan *et al.* 2012), mais les régulations sous-tendant cette réponse en hystérèse sont inconnues. Ici, nous avons démontré que l'îlot lui-même encode cette réponse. Celle-ci nécessite d'être caractérisée plus en détail afin d'en comprendre les mécanismes. Ainsi, des expériences devront être menées sur les îlots pour répondre à plusieurs questions. Les points à déterminer en priorité sont de savoir si cette réponse en hystérèse des *slow potentials* est également retrouvée dans les îlots humains. Il serait également intéressant de voir si la réponse des îlots est hystérétique pour des rampes de glucose dans des gammes encore moins étendues et donc plus physiologiques que celle testée dans notre étude. De plus, il est important de définir si cette hystérèse de l'activité électrique des îlots se retrouve au niveau fonctionnel, à savoir au niveau de la sécrétion d'insuline par les îlots. En outre, nous n'avons pas élucidé quels sont les mécanismes cellulaires à l'origine de cette réponse hystérétique. Des expériences de mesures calciques dans le compartiment mitochondrial, ou des mesures de la respiration mitochondriale pendant des rampes de glucose permettraient de déterminer si cette réponse se retrouve au niveau de l'activité métabolique des cellules β . Cette réponse pourrait au contraire n'être un phénomène que purement électrique et résulter par exemple de la cinétique des événements ioniques impliqués dans l'activité électrique de la cellule β , comme par exemple la désensibilisation de certains canaux voltage-dépendants. Cette question pourra être étudiée en analysant l'activité en *slow potentials* des îlots pendant l'altération de mécanismes impliqués à différentes étapes du couplage stimulus-sécrétion.

Il a été montré que l'hystérèse dans les taux circulants de peptide C chez l'Homme est modifiée chez les personnes intolérantes au glucose ou diabétiques (Keenan *et al.* 2012). Cela est-il également le cas pour l'hystérèse des *slow potentials*? La réponse à des rampes de glucose dans des îlots provenant de souris ayant subi un régime diabétogène gras et sucré pourrait nous indiquer si l'hystérèse existant dans la fréquence des *slow potentials* est altérée en situation pathologique. Si cela est effectivement le cas, la réponse hystérétique des îlots pourrait être un marqueur supplémentaire de la bonne fonction des îlots de Langerhans.

Une caractérisation plus poussée des *slow potentials* pourrait permettre de déterminer quels évènements ioniques sont exactement impliqués dans la génération de ce signal de couplage et si ceux-ci sont différents de ceux qui se produisent au cours du potentiel d'action. Par exemple, le courant K_{slow} est-il impliqué dans les *slow potentials* ? L'effet sur les *slow potentials* de drogues bloquant des canaux impliqués dans ce courant repolarisant, par exemple le TRAM-34 qui inhibe les K_{Ca} SK4, nous indiquera si ce courant K_{slow} est l'un des mécanismes par lequel les *slow potentials* sont rythmés.

Nous avons vu que lors des enregistrements des îlots partiellement dissociés, une plus grande proportion des électrodes couvertes sont porteuses d'un signal par rapport aux enregistrements effectués sur îlots entiers. Cette différence reflète très certainement la moins bonne adhérence des îlots entiers à la surface des électrodes, résultant en un moins bon contact entre les cellules et les électrodes, ce qui pourrait expliquer pourquoi certaines électrodes couvertes apparaissent électriquement silencieuses. Cependant, l'utilisation des îlots partiellement dissociés n'est pas un obstacle à l'étude de la physiologie des îlots, car les cellules se ré-agrègent entre elles après quelques heures de culture, reformant des clusters de cellules assimilables à des « pseudo-îlots ». Il a de plus été montré que le couplage entre des cellules isolées se remettait en place dans les cellules ré-agrégées (Johnson *et al.* 1974). De plus, ces pseudo-îlots s'organisent en monocouches, ce qui permet d'enregistrer l'activité des cellules d'un même cluster sur plusieurs électrodes différentes. Étant donné que les *slow potentials* reflètent l'activité syncytiale des cellules β , ce signal peut être utilisé pour évaluer le degré de synchronisation entre les activités enregistrées sur différentes électrodes du MEA. L'utilisation de MEAs customisés avec des électrodes plus petites et plus proches les unes des autres est envisagée pour étudier la synchronisation des signaux enregistrés sur différentes électrodes au sein d'un même cluster cellulaire. L'analyse de la dynamique de la propagation du signal entre les différentes électrodes sera ainsi utile pour tenter de déterminer si une cellule « pacemaker » rythme l'oscillation de l'ensemble du cluster ou si les mécanismes impliqués sont plus complexes.

Enfin, dans le cadre du projet de développement d'un biocapteur hybride mené au laboratoire, plusieurs autres questions devront être élucidées. En premier lieu, dans une optique de miniaturisation du système, ainsi que pour se rapprocher le plus possible de la situation physiologique, l'utilisation de la microfluidique sera intégrée à nos enregistrements électrophysiologiques. Des équipements microfluidiques sont en cours d'installation au laboratoire

(financement par la SATT Aquitaine), telles que des pompes spécialement dédiées à la perfusion de liquides sur des volumes microfluidiques, ou des MEA avec des circuits de microfluidiques intégrés dont le design est conçu au laboratoire pour répondre à nos besoins spécifiques. Il sera donc nécessaire d'étudier comment les *slow potentials* répondent au glucose lorsque celui-ci est appliqué avec les débits et les volumes du système microfluidique, notamment du point de vue de la dynamique de la réponse (travaux de Romain Perrier, en post-doctorat au laboratoire depuis Novembre 2013).

Afin d'augmenter les contacts entre les cellules et les électrodes, qui sont cruciaux dans le rapport signal/bruit au cours de nos enregistrements, un autre projet en cours (conduit par Eileen Pedraza, qui est venue dans notre laboratoire à partir de Février 2013 réaliser son post-doctorat après sa thèse à l'Université de Miami) a pour but d'attirer les cellules endommagées directement sur les électrodes par électrophorèse. Pour cela, les charges membranaires des cellules sont utilisées afin de les déplacer en appliquant un champ électrique à l'aide des électrodes du MEA (en appliquant un potentiel positif à certaines électrodes, et un potentiel négatif aux autres). Les cellules étant chargées positivement, elles sont repoussées des électrodes positivement chargées vers les électrodes négativement chargées. D'autres options d'enregistrement extracellulaire de l'activité électrique sont également envisagées et testées dans le cadre de ce projet, telles que les transistors.

Enfin, l'analyse en temps réel des potentiels d'action sera complétée par celle des *slow potentials* pour améliorer les algorithmes de classement automatique des signaux et perfectionner notre prototype de capteur bioélectronique.

2. GLUK2 ET VIEILLISSEMENT

2.1. Discussion des résultats

Les résultats préliminaires de cette étude en cours semblent indiquer que l'âge a un effet délétère sur la fonction des îlots de Langerhans. Étant donné que cet effet du vieillissement est mesurable au niveau de l'activité électrique des îlots, la sensibilité de ceux-ci au glucose est altérée. Il semblerait également que la sous-unité GluK2 des récepteurs ionotropiques au

glutamate soit impliquée dans les effets du vieillissement sur les îlots, car les îlots de souris invalidées pour GluK2 semblent conserver leur sensibilité au glucose avec l'âge, ce qui n'est pas le cas des îlots de souris sauvage.

Des mesures de la tolérance au glucose chez des souris jeunes des deux génotypes ont pu montrer que dès l'âge de 14 semaines, une différence significative apparaît entre la régulation de l'homéostasie glucidique entre les animaux des deux génotypes, les souris invalidées pour GluK2 présentant déjà une meilleure tolérance au glucose.

On peut alors se demander pourquoi une telle différence est observable dans l'animal entier alors que la sensibilité au glucose des îlots de souris, évaluée par la fréquence des *slow potentials*, étaient sensiblement la même entre les animaux de souris GluK2^{+/+} et GluK2^{-/-} à 10 semaines.

Une première explication possible est le temps auquel une différence est observable dans la tolérance au glucose entre les deux génotypes : celle-ci est en effet significative au bout de 90 minutes après l'administration intrapéritonéale de glucose. Or, les différentes conditions de glucose n'ont été appliquées que pendant 15 à 20 minutes au cours des enregistrements *in vitro* sur MEA : une application prolongée aurait peut-être permis de révéler une différence de réponse entre les îlots des deux génotypes.

Une autre hypothèse est que cette différence de tolérance au glucose n'est pas due à une meilleure fonction des îlots mais à une meilleure sensibilité à l'insuline, ou bien à l'existence d'autres mécanismes de régulation dans l'animal entier qui ne sont pas observables sur les îlots isolés. En effet, l'expression de GluK2 a été détectée dans l'hypothalamus (Koenig & Cho 2005), une structure cérébrale fortement impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Cependant, le glucose étant ici administré par injection intrapéritonéale, cela exclut l'intervention de la phase céphalique de la régulation de la sécrétion d'insuline. Toutefois, les modifications de la glycémie entraînée par l'injection se répercutent en tout vraisemblance dans la circulation hépato-portale. Dès lors, ces variations de glucose dans la veine porte doivent stimuler le détecteur hépato-portal dont l'activation entraîne une augmentation de la captation du glucose par les organes utilisateurs, cet effet étant en partie médié par une action hypothalamique (*cf.* chapitre 1).

Quoi qu'il en soit, bien que les résultats concernant la tolérance au glucose soient clairs, l'expérience *in vitro* présentée dans ce rapport préliminaire n'a pas été conduite sur

suffisamment d'animaux pour apporter des conclusions probantes sur les effets de la délétion du gène *Grik2* (codant pour GluK2). D'autres expériences sont donc nécessaires afin de pouvoir confirmer ces résultats.

2.2. Perspectives

Différentes expériences sont prévues dans la suite de ce projet de phénotypage des souris GluK2^{-/-}.

En premier lieu, il convient de déterminer si la différence de tolérance au glucose observée entre les deux génotypes à 14 semaines s'accroît avec l'âge. L'expérience de tolérance au glucose en réponse à une injection intrapéritonéale de glucose sera donc reproduite sur des animaux âgés de 45 semaines. La mesure des taux circulants d'insuline est également prévue pour compléter cette expérience. Si l'administration de glucose par injection intrapéritonéale a l'avantage d'induire une réponse sécrétoire impliquant principalement les îlots, il est également intéressant de pouvoir mesurer une réponse impliquant les mécanismes de régulation mis en jeu lors d'une situation plus physiologique de prise alimentaire. Des tests de tolérance au glucose en réponse à une administration orale de glucose, qui implique donc toutes les régulations céphaliques et entéro-insulaires, conduits sur les mêmes animaux sont en cours. Afin de déterminer si la différence de tolérance au glucose entre les différents groupes expérimentaux résulte d'une différence de la fonction des îlots ou d'une différence de sensibilité à l'insuline des tissus périphériques, des tests de tolérance à l'insuline seront également effectués afin d'évaluer la sensibilité à l'insuline chez ces animaux.

Si la différence observée dans la tolérance au glucose entre les génotypes s'amplifie avec l'âge, cela pourrait résulter d'une part d'un mécanisme indépendant des îlots, comme par exemple une différence de sensibilité des tissus cibles de l'insuline. La réponse à cette hypothèse sera apportée par les résultats des tests de tolérance à l'insuline sur l'animal entier. D'autre part, cette différence dans l'homéostasie du glucose pourrait également résulter d'une altération au niveau des îlots de Langerhans. Il faudra alors déterminer si cette altération implique un déficit fonctionnel des îlots, une modification de la masse des cellules β ou α , ou bien les deux phénomènes en parallèle.

Afin d'évaluer les changements fonctionnels des îlots avec l'âge, il convient de caractériser la réponse électrophysiologique des îlots des animaux GluK2^{+/+} et GluK2^{-/-} jeunes (10-15 semaines) et âgés (40-60 semaines) afin de confirmer les résultats de l'expérience préliminaire présentée dans cette étude. Enfin, étant donné que la cellule α est au centre de notre hypothèse, à plus long terme, les activités électrophysiologiques des cellules α seront également analysées dans les enregistrements MEAs des îlots provenant de souris des deux génotypes jeunes et âgés, afin de déterminer si la diminution de sensibilité des îlots (évaluée par les *slow potentials*) avec l'âge s'accompagne d'une modification de l'activité des cellules α (identifiées par la présence de potentiels d'action à bas glucose ou en présence d'adrénaline).

La réponse sécrétoire des îlots isolés pour chaque groupe expérimental sera également évaluée par des tests de sécrétion *in vitro* (et éventuellement par mesure de la capacitance membranaire en patch-clamp), pour déterminer si les sécrétions d'insuline et de glucagon, qui sont modifiées *in vivo* chez l'Homme âgé (Stumvoll *et al.* 1998, Iozzo *et al.* 1999), sont bien altérées au cours du vieillissement.

Comme indiqué plus haut, outre une modification de la fonction des cellules α ou des cellules β dans les îlots, une modification de la masse respective de l'un ou l'autre de ces types cellulaires pourrait également avoir lieu chez les animaux GluK2^{-/-} et/ou au cours du vieillissement. Pour élucider cette question, il est envisageable, dans le cadre d'une collaboration, de quantifier la masse des cellules β et α dans les îlots des souris jeunes et âgées pour voir si celle-ci change au cours du vieillissement, ainsi que dans les îlots de souris GluK2^{-/-}.

Enfin, afin de mieux comprendre les relations entre les réponses au glucose et les régulations portées par le glutamate dans les îlots, la pharmacologie des récepteurs GluK2 sera utilisée. Pour cela, des expériences électrophysiologiques par MEAs seront réalisées sur des îlots de souris sauvages pour évaluer les effets de l'application aigüe d'agonistes (Kainate) ou antagonistes (CNQX, UBP310) à des doses connues pour affecter l'activité de GluK2 spécifiquement.

3. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En conclusion, les travaux physiologiques réalisés au cours de ma thèse ont permis de révéler l'existence d'un nouveau signal électrophysiologique dans les îlots de Langerhans, qui constitue un marqueur du fonctionnement normal et physiologique des cellules β au sein de ce micro-organe. Il s'agit d'un signal facile à détecter dont l'analyse renseigne à propos de l'état métabolique et de l'activité des cellules β couplées entre elles, en réponse non seulement aux variations de glucose, mais également aux signaux de régulations extérieures aux îlots, tels que les incrétines ou les hormones de stress. La caractérisation détaillée des signaux électrophysiologiques des îlots de Langerhans enregistrés par MEA effectuée dans notre étude apporte des informations importantes sur la façon dont les îlots encodent toutes ces informations pour produire une réponse sécrétoire adaptée, et qui pourront être utilisées dans le contrôle-qualité pré-transplantation des îlots.

En effet, de nos jours, encore peu d'options existent pour évaluer la qualité d'îlots destinés à être transplantés chez un patient diabétique. Les méthodes permettant d'évaluer précisément la fonction des îlots prennent du temps et sont par conséquent incompatibles avec les délais courts qui doivent être respectés entre le prélèvement des îlots chez le ou les donneurs, et leur greffe chez un patient diabétique. Les tests rapides actuellement effectués avant la transplantation des îlots n'apportent que des informations superficielles sur l'aspect des îlots ou leur viabilité, mais ne renseignent pas sur leur bonne fonction (comme par exemple sur leur sensibilité au glucose, ou s'ils sont capables d'intégrer les signaux de régulation hormonale tels que le GLP-1 pour adapter leur réponse). Étant donné que la fréquence des *slow potentials* varie instantanément lors de faibles variations de glucose, ce signal semble adapté à l'analyse en temps réel de la fonction des îlots et pourra constituer un marqueur pour le contrôle-qualité des îlots à transplanter. Un projet (ISLETCIP, cf. objectifs de la thèse) a été initié pour définir des critères de la qualité des îlots. Au cours de ce projet, des échantillons de préparations d'îlots humains destinées à la transplantation seront systématiquement évalués par MEAs, afin de corrélérer *in fine* les réponses électrophysiologiques des échantillons avec le succès de la greffe (c'est-à-dire atteinte ou non de la tolérance au glucose et durée de celle-ci, ainsi que d'autres éléments tels que la survie des îlots greffés).

De même, nous avons ici abordé le problème posé par l'encodage de la sécrétion d'insuline au niveau de la réponse électrique des îlots, et avons proposé que les fréquences

immédiates des *slow potentials* étaient suffisantes pour coder la demande en insuline de l'organisme. La réponse en hystérèse lors d'une augmentation et d'une diminution de glucose par petits paliers démontre que les îlots possèdent leur propre algorithme interne pour encoder la demande en insuline. Pour pallier aux algorithmes complexes qui sont nécessaires pour déterminer la demande en insuline à partir des lecteurs de glycémie électrochimiques actuellement utilisés dans les tentatives de mise en place de circuits en boucle fermée pour l'administration d'insuline, notre solution est la suivante : puisque les îlots ont été façonnés pendant des milliers d'années pour cette fonction précise et qu'ils encodent l'état métabolique de l'organisme dans leur réponse électrique, nous proposons d'utiliser celle-ci pour créer un nouveau capteur hybride bioélectronique de la demande en insuline. Les *slow potentials* semblent être pour cela un signal idéal en raison de leur robustesse et du fait qu'ils semblent refléter l'encodage, effectué par les îlots, des niveaux de glucose ambiants.

Ce capteur, qui intègre l'enregistrement extracellulaire des signaux électrophysiologiques des îlots, leur traitement et analyse en temps réel au moyen de cartes microélectroniques, et des algorithmes de détermination de l'état des îlots et de la demande en insuline est actuellement au stade de prototype et est d'ores-et-déjà capable de détecter et analyser en temps réel les potentiels d'action générés par les îlots en réponse au glucose. Ce prototype servira de base au développement d'un dispositif de contrôle-qualité pré-transplantation d'îlots humains (Diaβeta^{CHIP}), et à plus long terme comme module de détection de la glycémie pour piloter une pompe à insuline dans le cadre d'un traitement par insuline administrée en boucle fermée (Diaβeta^{SENSOR}, Figure 34).

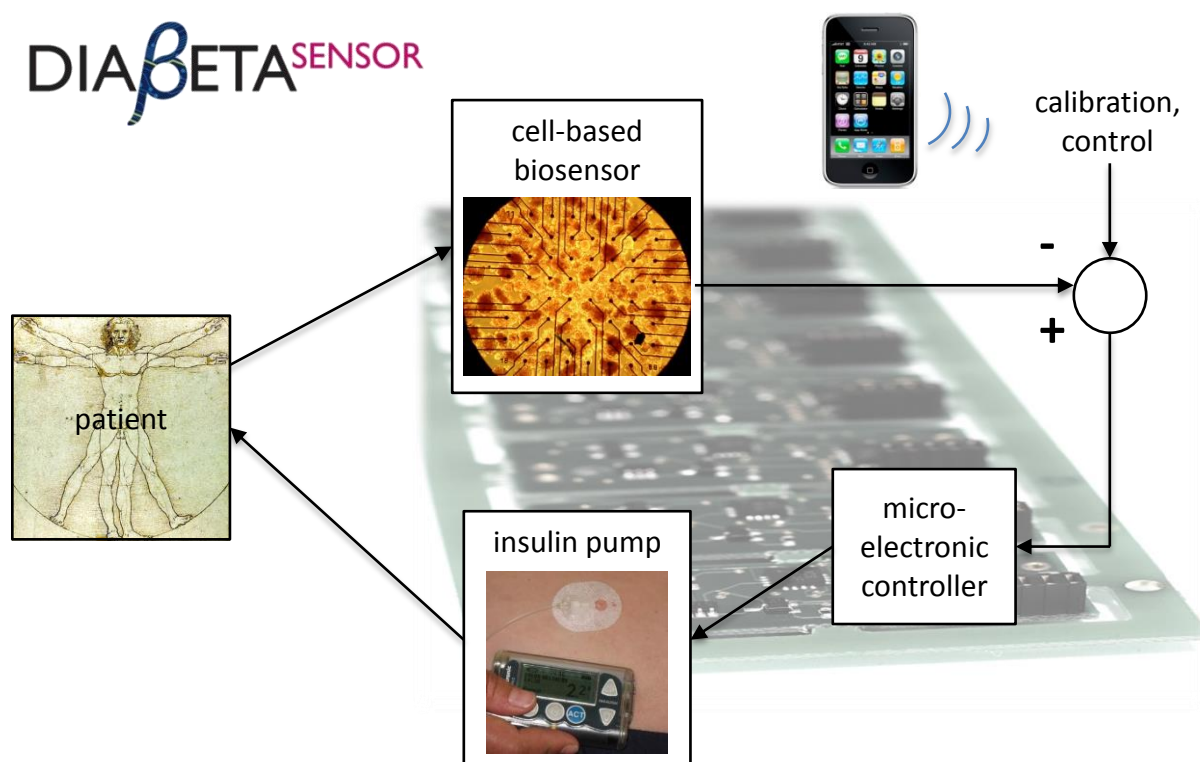


Figure 34 : Principe de fonctionnement du capteur hybride bioélectronique Diaβsensor

Diaβsensor est un système en boucle fermée dynamique capable de contrôler une pompe à insuline à partir des réponses physiologiques d'îlots sains aux taux de nutriments et d'hormones présents chez un patient diabétique. Tous les éléments de la boucle (le biocapteur, le contrôleur et la pompe à insuline, présentés dans la zone grisée) seront intégrés dans un appareil implantable à basse consommation. Un contrôle externe par une application smartphone ou par ordinateur assurera l'innocuité du système et contrôlera les phases de calibration. *D'après Renaud et al. (2014).*

ANNEXES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aathira, R. and V. Jain (2014). "Advances in management of type 1 diabetes mellitus." *World J Diabetes* 5: 689-696.
- Adeghate, E. (2012). *Orexins: Tissue Localization, Functions, and its Role in Diabetes. Vitamins and Hormones, Elsevier*. 89, Sleep hormones: 111-133.
- Ahlqvist, E., T. S. Ahluwalia and L. Groop (2011). "Genetics of type 2 diabetes." *Clin Chem* 57: 241-254.
- Ahrén, B. (2000). "Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease." *Diabetologia* 43: 393-410.
- Ahrén, B. (2006). "Neuropeptides and the Regulation of Islet Function." *Diabetes* 55: S98-S107.
- Ahrén, B. (2012). "Islet nerves in focus--defining their neurobiological and clinical role." *Diabetologia* 55: 3152-3154.
- Ainscow, E. K. and G. A. Rutter (2002). "Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet beta-cells: evidence for a Ca²⁺-dependent mechanism." *Diabetes* 51 Suppl 1: S162-170.
- Ali, O. (2010). *Type 1 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations. Principles in Diabetes Mellitus. L. Poretsky.*
- Ashcroft, F. M. (2005). "ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion." *J Clin Invest* 115: 2047-2058.
- Ashcroft, F. M., D. E. Harrison and S. J. Ashcroft (1984). "Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells." *Nature* 312: 446-448.
- Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (1989). "Electrophysiology of the pancreatic beta-cell." *Prog Biophys Mol Biol* 54: 87-143.
- Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (2004). "Molecular defects in insulin secretion in type-2 diabetes." *Rev Endocr Metab Disord* 5: 135-142.
- Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (2012). "Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years." *Cell* 148: 1160-1171.
- Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (2013). "K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies." *Nat Rev Endocrinol* 9: 660-669.
- Avolio, F., A. Pfeifer, M. Courtney, E. Gjernes, N. Ben-Othman, A. Vieira, N. Druelle, B. Faurite and P. Collombat (2013). "From pancreas morphogenesis to beta-cell regeneration." *Curr Top Dev Biol* 106: 217-238.

B

- Barbosa, R. M., A. M. Silva, A. R. Tome, J. A. Stamford, R. M. Santos and L. M. Rosario (1998). "Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics." *J Physiol* 510 (Pt 1): 135-143.
- Barg, S., L. Eliasson, E. Renstrom and P. Rorsman (2002). "A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells." *Diabetes* 51 Suppl 1: S74-82.
- Barg, S., X. Ma, L. Eliasson, J. Galvanovskis, S. O. Gopel, S. Obermuller, J. Platzter, E. Renstrom, M. Trus, D. Atlas, J. Striessnig and P. Rorsman (2001). "Fast exocytosis with few Ca²⁺ channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells." *Biophys J* 81: 3308-3323.
- Barnett, D. W., D. M. Pressel and S. Misler (1995). "Voltage-dependent Na⁺ and Ca²⁺ currents in human pancreatic islet beta-cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion." *Pflugers Arch* 431: 272-282.
- Bass, J. and J. S. Takahashi (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics." *Science* 330: 1349-1354.
- Bean, B. P. (2007). "The action potential in mammalian central neurons." *Nat Rev Neurosci* 8: 451-465.
- Beauvois, M. C., C. Merezak, J. C. Jonas, M. A. Ravier, J. C. Henquin and P. Gilon (2006). "Glucose-induced mixed [Ca²⁺]_i oscillations in mouse beta-cells are controlled by the membrane potential and the SERCA3 Ca²⁺-ATPase of the endoplasmic reticulum." *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1503-1511.
- Begg, D. P. and S. C. Woods (2013). "Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective." *Adv Physiol Educ* 37: 53-60.
- Bellisle, F., J. Louis-Sylvestre, F. Demozay, D. Blazy and J. Le Magnen (1983). "Reflex insulin response associated to food intake in human subjects." *Physiol Behav* 31: 515-521.
- Benninger, R. K., M. Zhang, W. S. Head, L. S. Satin and D. W. Piston (2008). "Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet." *Biophys J* 95: 5048-5061.
- Berbel, M. N., M. P. Pinto, D. Ponce and A. L. Balbi (2011). "Nutritional aspects in acute kidney injury." *Rev Assoc Med Bras* 57: 600-606.
- Bergsten, P. (1995). "Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release." *Am J Physiol* 268: E282-287.

- Bergsten, P. (1998). "Glucose-induced pulsatile insulin release from single islets at stable and oscillatory cytoplasmic Ca^{2+} ." *Am J Physiol* 274: E796-800.
- Bergsten, P. and B. Hellman (1993). "Glucose-induced amplitude regulation of pulsatile insulin secretion from individual pancreatic islets." *Diabetes* 42: 670-674.
- Bergsten, P., J. Westerlund, P. Liss and P. O. Carlsson (2002). "Primary in vivo oscillations of metabolism in the pancreas." *Diabetes* 51: 699-703.
- Bertram, R., A. Sherman and L. S. Satin (2010). "Electrical bursting, calcium oscillations, and synchronization of pancreatic islets." *Adv Exp Med Biol* 654: 261-279.
- Bertrand, G., R. Gross, R. Puech, M. M. Loubatieres-Mariani and J. Bockaert (1993). "Glutamate stimulates glucagon secretion via an excitatory amino acid receptor of the AMPA subtype in rat pancreas." *Eur J Pharmacol* 237: 45-50.
- Best, L. (1997). "Glucose and alpha-ketoisocaproate induce transient inward currents in rat pancreatic beta cells." *Diabetologia* 40: 1-6.
- Bode, H. P., S. Weber, H. C. Fehmann and B. Goke (1999). "A nutrient-regulated cytosolic calcium oscillator in endocrine pancreatic glucagon-secreting cells." *Pflugers Arch* 437: 324-334.
- Bogan, J. S. (2012). "Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes." *Annu Rev Biochem* 81: 507-532.
- Bokvist, K., L. Eliasson, C. Ammala, E. Renstrom and P. Rorsman (1995). "Co-localization of L-type Ca^{2+} channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells." *EMBO J* 14: 50-57.
- Bonaventura, M. M., P. N. Catalano, A. Chamson-Reig, E. Arany, D. Hill, B. Bettler, F. Saravia, C. Libertun and V. A. Lux-Lantos (2008). "GABAB receptors and glucose homeostasis: evaluation in GABAB receptor knockout mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E157-167.
- Bornat, Y., M. Raoux, Y. Boutaib, F. Morin, G. Charpentier, J. Lang and S. Renaud (2010). Detection of electrical activity of pancreatic beta-cells using micro-electrode arrays. 5th IEEE Int. Symposium on Electronic Design, Test & Applications - DELTA 2010, Ho Chi Minh City, VietNam.
- Bosco, D., M. Armanet, P. Morel, N. Niclauss, A. Sgroi, Y. D. Muller, L. Giovannoni, G. Parnaud and T. Berney (2010). "Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans." *Diabetes* 59: 1202-1210.
- Bosco, D., J. A. Haefliger and P. Meda (2011). "Connexins: key mediators of endocrine function." *Physiol Rev* 91: 1393-1445.
- Branstrom, R., S. Efendic, P. O. Berggren and O. Larsson (1998). "Direct inhibition of the pancreatic beta-cell ATP-regulated potassium channel by alpha-ketoisocaproate." *J Biol Chem* 273: 14113-14118.
- Brass, B. J., Z. Abelev, E. P. Liao and L. Poretsky (2010). *Endocrine Pancreas. Principles of Diabetes Mellitus*. L. Poretsky, Springer.
- Braun, M., R. Ramracheya, M. Bengtsson, A. Clark, J. N. Walker, P. R. Johnson and P. Rorsman (2010). "Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic beta-cells." *Diabetes* 59: 1694-1701.
- Braun, M., R. Ramracheya, M. Bengtsson, Q. Zhang, J. Karanaukaite, C. Partridge, P. R. Johnson and P. Rorsman (2008). "Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion." *Diabetes* 57: 1618-1628.
- Braun, M., R. Ramracheya and P. Rorsman (2012). "Autocrine regulation of insulin secretion." *Diabetes Obes Metab* 14 Suppl 3: 143-151.
- Brissova, M., M. J. Fowler, W. E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D. M. Harlan and A. C. Powers (2005). "Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy." *J Histochem Cytochem* 53: 1087-1097.
- Brissova, M. and A. C. Powers (2008). *Architecture of Pancreatic Islets. Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. S. Seino and G. I. Bell, Springer: 3-11.
- Brouhard, B. H. (1992a). "Hypoglycemia. Frequency, severity, and consequences." *Diabetes Care* 15: 582-583.
- Brouhard, B. H. (1992b). "Long-term neurological consequences of hypoglycemia." *Diabetes Care* 15: 583-584.
- Browning, K. N. (2013). "Modulation of gastrointestinal vagal neurocircuits by hyperglycemia." *Front Neurosci* 7: 217.
- Bruni, A., B. Gala-Lopez, A. R. Pepper, N. S. Abualhasan and A. J. Shapiro (2014). "Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges." *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 211-223.
- Brunicardi, F. C., R. Kleinman, S. Moldovan, T. H. Nguyen, P. C. Watt, J. Walsh and R. Gingerich (2001). "Immunoneutralization of somatostatin, insulin, and glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas." *Pancreas* 23: 302-308.
- Buhmann, H., C. W. le Roux and M. Bueter (2014). "The gut-brain axis in obesity." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28: 559-571.
- Butler, A. E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza and P. C. Butler (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." *Diabetes* 52: 102-110.

C

- Cabrera, O., D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P. O. Berggren and A. Caicedo (2006). "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2334-2339.
- Cabrera, O., M. C. Jacques-Silva, S. Speier, S. N. Yang, M. Kohler, A. Fachado, E. Vieira, J. R. Zierath, R. Kibbey, D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, A. Caicedo and P. O. Berggren (2008). "Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release." *Cell Metab* 7: 545-554.
- Caicedo, A. (2013). "Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye." *Semin Cell Dev Biol* 24: 11-21.
- Calabrese, A., M. Guldenagel, A. Charollais, C. Mas, D. Caton, J. Bauquis, V. Serre-Beinier, D. Caille, G. Sohl, B. Teubner, S. Le Gurun, A. Trovato-Salinaro, D. F. Condorelli, J. A. Haefliger, K. Willecke and P. Meda (2001). "Cx36 and the function of endocrine pancreas." *Cell Commun Adhes* 8: 387-391.
- Calabrese, A., M. Zhang, V. Serre-Beinier, D. Caton, C. Mas, L. S. Satin and P. Meda (2003). "Connexin 36 controls synchronization of Ca²⁺ oscillations and insulin secretion in MIN6 cells." *Diabetes* 52: 417-424.
- Campbell, J. E. and D. J. Drucker (2013). "Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action." *Cell Metab* 17: 819-837.
- Carvalho, C. P., H. C. Barbosa, A. Britan, J. C. Santos-Silva, A. C. Boscherio, P. Meda and C. B. Collares-Buzato (2009). "Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets." *Diabetologia* 53: 1428-1437.
- Carvalho, C. P., R. B. Oliveira, A. Britan, J. C. Santos-Silva, A. C. Boscherio, P. Meda and C. B. Collares-Buzato (2012). "Impaired beta-cell-beta-cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E144-151.
- Castan-Laurell, I., C. Dray, C. Attane, T. Duparc, C. Knauf and P. Valet (2011). "Apelin, diabetes, and obesity." *Endocrine* 40: 1-9.
- Chabot, F., A. Caron, M. Laplante and D. H. St-Pierre (2014). "Interrelationships between ghrelin, insulin and glucose homeostasis: Physiological relevance." *World J Diabetes* 5: 328-341.
- Charollais, A., A. Gjinovci, J. Huarte, J. Bauquis, A. Nadal, F. Martin, E. Andreu, J. V. Sanchez-Andres, A. Calabrese, D. Bosco, B. Soria, C. B. Wollheim, P. L. Herrera and P. Meda (2000). "Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance." *J Clin Invest* 106: 235-243.
- Charpentier, E., J. Cancela and P. Meda (2007). "Beta cells preferentially exchange cationic molecules via connexin 36 gap junction channels." *Diabetologia* 50: 2332-2341.
- Cheatham, B. and C. R. Kahn (1995). "Insulin action and the insulin signaling network." *Endocr Rev* 16: 117-142.
- Chen, S., A. Ogawa, M. Ohneda, R. H. Unger, D. W. Foster and J. D. McGarry (1994). "More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling." *Diabetes* 43: 878-883.
- Chera, S., D. Baronnier, L. Ghila, V. Cigliola, J. N. Jensen, G. Gu, K. Furuyama, F. Thorel, F. M. Gribble, F. Reimann and P. L. Herrera (2014). "Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic delta-cells into insulin producers." *Nature* 514: 503-507.
- Cheung, K. C. (2007). "Implantable microscale neural interfaces." *Biomed Microdevices* 9: 923-938.
- Chiu, Y. C., T. E. Hua, Y. Y. Fu, P. J. Pasricha and S. C. Tang (2012). "3-D imaging and illustration of the perfusive mouse islet sympathetic innervation and its remodelling in injury." *Diabetologia* 55: 3252-3261.
- Cho, Y. M., Y. Fujita and T. J. Kieffer (2014). "Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond." *Annu Rev Physiol* 76: 535-559.
- Chou, H. F., N. Berman and E. Ipp (1992). "Oscillations of lactate released from islets of Langerhans: evidence for oscillatory glycolysis in beta-cells." *Am J Physiol* 262: E800-805.
- Cigliola, V., V. Chellakudam, W. Arabieter and P. Meda (2012). "Connexins and beta-cell functions." *Diabetes Res Clin Pract* 99: 250-259.
- Cobelli, C., E. Renard and B. Kovatchev (2011). "Artificial pancreas: past, present, future." *Diabetes* 60: 2672-2682.
- Cook, D. L. (1983). "Isolated islets of Langerhans have slow oscillations of electrical activity." *Metabolism* 32: 681-685.
- Cook, D. L., L. S. Satin and W. F. Hopkins (1991). "Pancreatic B cells are bursting, but how?" *Trends Neurosci* 14: 411-414.
- Coppieters, K. T., L. C. Harrison and M. G. von Herrath (2013). "Trials in type 1 diabetes: Antigen-specific therapies." *Clin Immunol* 149: 345-355.
- Corbett, J. A. (2001). "K cells: a novel target for insulin gene therapy for the prevention of diabetes." *Trends Endocrinol Metab* 12: 140-142.
- Corkey, B. E., M. C. Glennon, K. S. Chen, J. T. Deeney, F. M. Matschinsky and M. Prentki (1989). "A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* 264: 21608-21612.
- Curry, D. L., L. L. Bennett and G. M. Grodsky (1968). "Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas." *Endocrinology* 83: 572-584.

D

Dai, X. Q., J. E. Manning Fox, D. Chikvashvili, M. Casimir, G. Plummer, C. Hajmrle, A. F. Spigelman, T. Kin, D. Singer-Lahat, Y. Kang, A. M. Shapiro, H. Y. Gaisano, I. Lotan and P. E. Macdonald (2012). "The voltage-dependent potassium channel subunit Kv2.1 regulates insulin secretion from rodent and human islets independently of its electrical function." *Diabetologia* 55: 1709-1720.

De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers and F. Schuit (1995). "Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression." *J Clin Invest* 96: 2489-2495.

Dean, P. M. and E. K. Matthews (1968). "Electrical activity in pancreatic islet cells." *Nature* 219: 389-390.

Dean, P. M. and E. K. Matthews (1970a). "Electrical activity in pancreatic islet cells: effect of ions." *J Physiol* 210: 265-275.

Dean, P. M. and E. K. Matthews (1970b). "Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells." *J Physiol* 210: 255-264.

Deeney, J. T., J. Gromada, M. Hoy, H. L. Olsen, C. J. Rhodes, M. Prentki, P. O. Berggren and B. E. Corkey (2000). "Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells)." *J Biol Chem* 275: 9363-9368.

Deleze, J. (1970). "The recovery of resting potential and input resistance in sheep heart injured by knife or laser." *J Physiol* 208: 547-562.

Dixon, J. B., C. W. le Roux, F. Rubino and P. Zimmet (2012). "Bariatric surgery for type 2 diabetes." *Lancet* 379: 2300-2311.

Dong, H., M. Kumar, Y. Zhang, A. Gyulkhandanyan, Y. Xiang, B. Ye, J. Perrella, A. Hyder, N. Zhang, M. Wheeler, W. Y. Lu and Q. Wang (2006). "Gamma-aminobutyric acid up- and downregulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration." *Diabetologia* 49: 697-705.

Dostou, J. M. and D. Einhorn (2001). "The genesis and consequences of postprandial hyperglycemia." *Postgrad Med* 110: 5-13.

Dou, H., C. Wang, X. Wu, L. Yao, X. Zhang, S. Teng, H. Xu, B. Liu, Q. Wu, Q. Zhang, M. Hu, Y. Wang, L. Wang, Y. Wu, S. Shang, X. Kang, L. Zheng, J. Zhang, M. Raoux, J. Lang, Q. Li, J. Su, X. Yu, L. Chen and Z. Zhou (2015). "Calcium influx activates adenylyl cyclase 8 for sustained insulin secretion in rat pancreatic beta cells." *Diabetologia* 58: 324-333.

Drews, G., P. Krippeit-Drews and M. Dufer (2010). "Electrophysiology of islet cells." *Adv Exp Med Biol* 654: 115-163.

Dyachok, O., O. Idevall-Hagren, J. Sagetorp, G. Tian, A. Wuttke, C. Arrieumerlou, G. Akusjarvi, E. Gylfe and A.

Tengholm (2008). "Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion." *Cell Metab* 8: 26-37.

E

Eiberger, J., J. Degen, A. Romualdi, U. Deutsch, K. Willecke and G. Sohl (2001). "Connexin genes in the mouse and human genome." *Cell Commun Adhes* 8: 163-165.

Eliasson, L., F. Abdulkader, M. Braun, J. Galvanovskis, M. B. Hoppa and P. Rorsman (2008). "Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion." *J Physiol* 586: 3313-3324.

Erecinska, M. and I. A. Silver (1992). "Relationship between ions and energy metabolism: cerebral calcium movements during ischaemia and subsequent recovery." *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl: S190-193.

Erlandsen, S. L., O. D. Hegre, J. A. Parsons, R. C. McEvoy and R. P. Elde (1976). "Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cell." *J Histochem Cytochem* 24: 883-897.

Eto, K., S. Suga, M. Wakui, Y. Tsubamoto, Y. Terauchi, J. Taka, S. Aizawa, M. Noda, S. Kimura, H. Kasai and T. Kadowaki (1999). "NADH shuttle system regulates K(ATP) channel-dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca(2+) concentration elevation in glucose-induced insulin secretion." *J Biol Chem* 274: 25386-25392.

Ezcurra, M., F. Reimann, F. M. Gribble and E. Emery (2013). "Molecular mechanisms of incretin hormone secretion." *Curr Opin Pharmacol* 13: 922-927.

F

Falciglia, M. (2007). "Causes and consequences of hyperglycemia in critical illness." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 498-503.

Farnsworth, N. L. and R. K. Benninger (2014). "New insights into the role of connexins in pancreatic islet function and diabetes." *FEBS Lett* 588: 1278-1287.

Feng, B., T. Zhang and H. Xu (2013). "Human adipose dynamics and metabolic health." *Ann N Y Acad Sci* 1281: 160-177.

Fernandez, J. and M. Valdeolmillos (2000). "Synchronous glucose-dependent [Ca(2+)](i) oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans recorded in vivo." *FEBS Lett* 477: 33-36.

Fonseca, V. and J. John-Kalarickal (2010). *Type 2 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations. Principles of Diabetes Mellitus*. L. Poretsky, Springer: 203-220.

Franklin, I., J. Gromada, A. Gjinovci, S. Theander and C. B. Wollheim (2005). "Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release." *Diabetes* 54: 1808-1815.

Franklin, I. K. and C. B. Wollheim (2004). "GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule." *J Gen Physiol* 123: 185-190.

Fujimoto, W., T. Miki, T. Ogura, M. Zhang, Y. Seino, L. S. Satin, H. Nakaya and S. Seino (2009). "Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated insulin secretion by cyclic AMP in mice." *Diabetologia* 52: 863-872.

Fujita, T. (1991). "Endocrine gut and pancreas: cell-biological and phylogenetic aspect." *Bull Assoc Anat (Nancy)* 75: 151-152.

G

Geloneze, B., M. D. de Oliveira, A. C. Vasques, F. S. Novaes, J. C. Pareja and M. A. Tambascia (2014). "Impaired incretin secretion and pancreatic dysfunction with older age and diabetes." *Metabolism*.

Gembal, M., P. Detimary, P. Gilon, Z. Y. Gao and J. C. Henquin (1993). "Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mouse B cells." *J Clin Invest* 91: 871-880.

Gembal, M., P. Gilon and J. C. Henquin (1992). "Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells." *J Clin Invest* 89: 1288-1295.

Gerich, J. E. (2014). "Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications." *Diabet Med* 27: 136-142.

Gilon, P. and J. C. Henquin (2001). "Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function." *Endocr Rev* 22: 565-604.

Gilon, P., R. M. Shepherd and J. C. Henquin (1993). "Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ as evidences in single pancreatic islets." *J Biol Chem* 268: 22265-22268.

Godoy-Matos, A. F. (2014). "The role of glucagon on type 2 diabetes at a glance." *Diabetol Metab Syndr* 6: 91.

Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2009). "Gap junctions." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a002576.

Gopel, S., Q. Zhang, L. Eliasson, X. S. Ma, J. Galvanovskis, T. Kanno, A. Salehi and P. Rorsman (2004). "Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans." *J Physiol* 556: 711-726.

Gopel, S. O., T. Kanno, S. Barg, L. Eliasson, J. Galvanovskis, E. Renstrom and P. Rorsman (1999).

"Activation of Ca(2+)-dependent K(+) channels contributes to rhythmic firing of action potentials in mouse pancreatic beta cells." *J Gen Physiol* 114: 759-770.

Grapengiesser, E., E. Gylfe and B. Hellman (1988). "Glucose-induced oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in the pancreatic beta-cell." *Biochem Biophys Res Commun* 151: 1299-1304.

Gromada, J., W. G. Ding, S. Barg, E. Renstrom and P. Rorsman (1997). "Multisite regulation of insulin secretion by cAMP-increasing agonists: evidence that glucagon-like peptide 1 and glucagon act via distinct receptors." *Pflugers Arch* 434: 515-524.

Gromada, J., I. Franklin and C. B. Wollheim (2007). "Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains." *Endocr Rev* 28: 84-116.

Gromada, J., J. J. Holst and P. Rorsman (1998). "Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1." *Pflugers Arch* 435: 583-594.

Groop, L. and V. Lyssenko (2009). "Genetic basis of beta-cell dysfunction in man." *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4: 149-158.

Gryniewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* 260: 3440-3450.

Guariguata, L. (2013). "By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012." *Diabetes Res Clin Pract* 98: 524-525.

Gylfe, E. (2013). "Glucose control of glucagon secretion: there is more to it than KATP channels." *Diabetes* 62: 1391-1393.

Gylfe, E. and P. Gilon (2014). "Glucose regulation of glucagon secretion." *Diabetes Res Clin Pract* 103: 1-10.

H

Halban, P. A. (2004). "Cellular sources of new pancreatic beta cells and therapeutic implications for regenerative medicine." *Nat Cell Biol* 6: 1021-1025.

Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* 391: 85-100.

Hammes, H. P., Y. Feng, F. Pfister and M. Brownlee (2011). "Diabetic retinopathy: targeting vasoregression." *Diabetes* 60: 9-16.

Hardy, A. B., A. S. Serino, N. Wijesekara, F. Chimienti and M. B. Wheeler (2011). "Regulation of glucagon secretion by zinc: lessons from the beta cell-specific Znt8 knockout mouse model." *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1: 112-117.

Hay, J. C. and T. F. Martin (1992). "Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins." *J Cell Biol* 119: 139-151.

Hayashi, M., M. Otsuka, R. Morimoto, S. Hirota, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto and Y. Moriyama (2001). "Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems." *J Biol Chem* 276: 43400-43406.

Hayashi, M., M. Otsuka, R. Morimoto, A. Muroyama, S. Uehara, A. Yamamoto and Y. Moriyama (2003a). "Vesicular inhibitory amino acid transporter is present in glucagon-containing secretory granules in alphaTC6 cells, mouse clonal alpha-cells, and alpha-cells of islets of Langerhans." *Diabetes* 52: 2066-2074.

Hayashi, M., H. Yamada, S. Uehara, R. Morimoto, A. Muroyama, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto and Y. Moriyama (2003b). "Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans." *J Biol Chem* 278: 1966-1974.

Head, W. S., M. L. Orseth, C. S. Nunemaker, L. S. Satin, D. W. Piston and R. K. Benninger (2012). "Connexin-36 gap junctions regulate in vivo first- and second-phase insulin secretion dynamics and glucose tolerance in the conscious mouse." *Diabetes* 61: 1700-1707.

Hedekov, C. J., K. Capito and P. Thams (1987). "Cytosolic ratios of free [NADPH]/[NADP⁺] and [NADH]/[NAD⁺] in mouse pancreatic islets, and nutrient-induced insulin secretion." *Biochem J* 241: 161-167.

Heller, S. and J. D. Ward (1993). "Neurologic consequences of hypoglycemia and pathogenic mechanisms involved in diabetic neuropathy." *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6: 423-428.

Henderson, J. R. and M. C. Moss (1985). "A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas." *Q J Exp Physiol* 70: 347-356.

Henquin, J. C. (2000). "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose." *Diabetes* 49: 1751-1760.

Henquin, J. C. (2009). "Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation." *Diabetologia* 52: 739-751.

Henquin, J. C. (2011). "The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in beta-cells." *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1: S27-31.

Henquin, J. C. and H. P. Meissner (1984). "Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells." *Experientia* 40: 1043-1052.

Henquin, J. C., H. P. Meissner and W. Schmeer (1982). "Cyclic variations of glucose-induced electrical activity in pancreatic B cells." *Pflugers Arch* 393: 322-327.

Heppner, K. M., K. M. Habegger, J. Day, P. T. Pfluger, D. Perez-Tilve, B. Ward, V. Gelfanov, S. C. Woods, R. DiMarchi and M. Tschoep (2010). "Glucagon regulation of energy metabolism." *Physiol Behav* 100: 545-548.

Herrington, J. (2007). "Gating modifier peptides as probes of pancreatic beta-cell physiology." *Toxicon* 49: 231-238.

Herve, J. C. and M. Derangeon (2013). "Gap-junction-mediated cell-to-cell communication." *Cell Tissue Res* 352: 21-31.

Herve, J. C., I. Plaisance, J. Loncarek, F. Duthe and D. Sarrouilhe (2004). "Is the junctional uncoupling elicited in rat ventricular myocytes by some dephosphorylation treatments due to changes in the phosphorylation status of Cx43?" *Eur Biophys J* 33: 201-210.

Hevener, A. L., R. N. Bergman and C. M. Donovan (1997). "Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein." *Diabetes* 46: 1521-1525.

Holmkvist, J., D. Tojjar, P. Almgren, V. Lyssenko, C. M. Lindgren, B. Isomaa, T. Tuomi, G. Berglund, E. Renstrom and L. Groop (2007). "Polymorphisms in the gene encoding the voltage-dependent Ca(2+) channel Ca (V)2.3 (CACNA1E) are associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion." *Diabetologia* 50: 2467-2475.

Holz, R. W., J. Senyshyn and M. A. Bittner (1991). "Mechanisms involved in calcium-dependent exocytosis." *Ann N Y Acad Sci* 635: 382-392.

Houamed, K. M., I. R. Sweet and L. S. Satin (2010). "BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells." *J Physiol* 588: 3511-3523.

I

Imfeld, K., S. Neukom, A. Maccione, Y. Bornat, S. Martinoia, P. A. Farine, M. Koudelka-Hep and L. Berdondini (2008). "Large-scale, high-resolution data acquisition system for extracellular recording of electrophysiological activity." *IEEE Trans Biomed Eng* 55: 2064-2073.

In't Veld, P. and M. Marichal (2010). "Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans." *Adv Exp Med Biol* 654: 1-19.

Inagaki, N., H. Kuromi, T. Gonoi, Y. Okamoto, H. Ishida, Y. Seino, T. Kaneko, T. Iwanaga and S. Seino (1995). "Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells." *FASEB J* 9: 686-691.

Iozzo, P., H. Beck-Nielsen, M. Laakso, U. Smith, H. Yki-Jarvinen and E. Ferrannini (1999). "Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. European Group for the Study of Insulin Resistance." *J Clin Endocrinol Metab* 84: 863-868.

Ishihara, H., P. Maechler, A. Gjnovci, P. L. Herrera and C. B. Wollheim (2003). "Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells." *Nat Cell Biol* 5: 330-335.

Ishihara, H., H. Wang, L. R. Drewes and C. B. Wollheim (1999). "Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells." *J Clin Invest* 104: 1621-1629.

J

Jacobson, D. A., A. Kuznetsov, J. P. Lopez, S. Kash, C. E. Ammala and L. H. Philipson (2007). "Kv2.1 ablation alters glucose-induced islet electrical activity, enhancing insulin secretion." *Cell Metab* 6: 229-235.

Jacobson, D. A., F. Mendez, M. Thompson, J. Torres, O. Cochet and L. H. Philipson (2010). "Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses." *J Physiol* 588: 3525-3537.

Jahansou, C., S. C. Kumer, M. Ellenbogen and K. L. Brayman (2011). "Evolution of beta-Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Pancreas Transplantation." *Diabetes Technol Ther* 13: 395-418.

Jellinger, P. S. (2007). "Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance." *Clin Cornerstone* 8 Suppl 7: S30-42.

Jing, X., D. Q. Li, C. S. Olofsson, A. Salehi, V. V. Surve, J. Caballero, R. Ivarsson, I. Lundquist, A. Pereverzev, T. Schneider, P. Rorsman and E. Renstrom (2005). "CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release." *J Clin Invest* 115: 146-154.

Johnson, R., M. Hammer, J. Sheridan and J. P. Revel (1974). "Gap junction formation between reaggregated Novikoff hepatoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4536-4540.

Johnstone, A. F., G. W. Gross, D. G. Weiss, O. H. Schroeder, A. Gramowski and T. J. Shafer (2010). "Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century." *Neurotoxicology* 31: 331-350.

Jones, B. J., T. Tan and S. R. Bloom (2012). "Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis." *Endocrinology* 153: 1049-1054.

Jones, I. L., P. Livi, M. K. Lewandowska, M. Fiscella, B. Rosic and A. Hierlemann (2010). "The potential of microelectrode arrays and microelectronics for biomedical research and diagnostics." *Anal Bioanal Chem* 399: 2313-2329.

Jonkers, F. C., J. C. Jonas, P. Gilon and J. C. Henquin (1999). "Influence of cell number on the characteristics and synchrony of Ca²⁺ oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells." *J Physiol* 520 Pt 3: 839-849.

Jung, S. K., C. A. Aspinwall and R. T. Kennedy (1999). "Detection of multiple patterns of oscillatory oxygen consumption in single mouse islets of Langerhans." *Biochem Biophys Res Commun* 259: 331-335.

Jung, S. K., L. M. Kauri, W. J. Qian and R. T. Kennedy (2000). "Correlated oscillations in glucose consumption, oxygen consumption, and intracellular free Ca(2+) in single islets of Langerhans." *J Biol Chem* 275: 6642-6650.

Juszczak, G. R. and A. H. Swiergiel (2009). "Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 181-198.

K

Kanno, T., P. Rorsman and S. O. Gopel (2002). "Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta-cells by K(ATP)-channel modulation." *J Physiol* 545: 501-507.

Kapica, M., D. Laubitz, I. Puzio, A. Jankowska and R. Zabielski (2006). "The ghrelin pentapeptide inhibits the secretion of pancreatic juice in rats." *J Physiol Pharmacol* 57: 691-700.

Keenan, D. M., R. Basu, Y. Liu, A. Basu, G. Bock and J. D. Veldhuis (2012). "Logistic model of glucose-regulated C-peptide secretion: hysteresis pathway disruption in impaired fasting glycemia." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E397-409.

Kelly, R. P., R. Sutton and F. M. Ashcroft (1991). "Voltage-activated calcium and potassium currents in human pancreatic beta-cells." *J Physiol* 443: 175-192.

Kennedy, R. T., L. M. Kauri, G. M. Dahlgren and S. K. Jung (2002). "Metabolic oscillations in beta-cells." *Diabetes* 51 Suppl 1: S152-161.

Khan, S., R. Yan-Do, E. Duong, X. Wu, A. Bautista, S. Cheley, P. E. MacDonald and M. Braun (2014). "Autocrine activation of P2Y1 receptors couples Ca (2+) influx to Ca (2+) release in human pancreatic beta cells." *Diabetologia* 57: 2535-2545.

Klee, P., F. Allagnat, H. Pontes, M. Cederroth, A. Charollais, D. Caille, A. Britan, J. A. Haefliger and P. Meda (2011). "Connexins protect mouse pancreatic beta cells against apoptosis." *J Clin Invest* 121: 4870-4879.

Klee, P., S. Bavamian, A. Charollais, D. Caille, J. Cancela, M. Peyrou and P. Meda (2008). Gap Junctions and Insulin Secretion. *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. S. Seino and G. I. Bell, Springer: 431-450.

Koenig, J. I. and J. Y. Cho (2005). "Provocation of kainic acid receptor mRNA changes in the rat paraventricular nucleus by insulin-induced hypoglycaemia." *J Neuroendocrinol* 17: 111-118.

Krippeit-Drews, P., M. Dufer and G. Drews (2000). "Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells." *Biochem Biophys Res Commun* 267: 179-183.

L

Lacherade, J. C. and S. Jacqueminet (2009). "[Consequences of hypoglycemia]." *Ann Fr Anesth Reanim* 28: e201-208.

Laird, D. W. (2006). "Life cycle of connexins in health and disease." *Biochem J* 394: 527-543.

Laird, D. W. (2010). "The gap junction proteome and its relationship to disease." *Trends Cell Biol* 20: 92-101.

Lang, D. A., D. R. Matthews, J. Peto and R. C. Turner (1979). "Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings." *N Engl J Med* 301: 1023-1027.

Lang, J. (1999). "Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion." *Eur J Biochem* 259: 3-17.

Lang, J., M. Fukuda, H. Zhang, K. Mikoshiba and C. B. Wollheim (1997a). "The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium." *EMBO J* 16: 5837-5846.

Lang, J., I. Nishimoto, T. Okamoto, R. Regazzi, C. Kiraly, U. Weller and C. B. Wollheim (1995). "Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases Gi and G(o) or by the expression of their active G alpha subunits." *EMBO J* 14: 3635-3644.

Lang, J., Y. Ushkaryov, A. Grasso and C. B. Wollheim (1998). "Ca²⁺-independent insulin exocytosis induced by alpha-latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor." *EMBO J* 17: 648-657.

Lang, J., H. Zhang, V. V. Vaidyanathan, K. Sadoul, H. Niemann and C. B. Wollheim (1997b). "Transient expression of botulinum neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal beta-cells." *FEBS Lett* 419: 13-17.

Larsson, O., H. Kindmark, R. Brandstrom, B. Fredholm and P. O. Berggren (1996). "Oscillations in KATP channel activity promote oscillations in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in the pancreatic beta cell." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5161-5165.

Lawrence, A. M. (1969). "Glucagon." *Annu Rev Med* 20: 207-222.

Le Gurun, S., D. Martin, A. Formenton, P. Maechler, D. Caille, G. Waeber, P. Meda and J. A. Haefliger (2003). "Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells." *J Biol Chem* 278: 37690-37697.

Le Marchand, S. J. and D. W. Piston (2010). "Glucose suppression of glucagon secretion: metabolic and calcium responses from alpha-cells in intact mouse pancreatic islets." *J Biol Chem* 285: 14389-14398.

Leibiger, I. B., B. Leibiger and P. O. Berggren (2008). "Insulin signaling in the pancreatic beta-cell." *Annu Rev Nutr* 28: 233-251.

Leite, A. R., C. P. Carvalho, A. G. Furtado, H. C. Barbosa, A. C. Boschero and C. B. Collares-Buzato (2005). "Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets." *Can J Physiol Pharmacol* 83: 142-151.

Levin, B. E., C. Magnan, A. Dunn-Meynell and C. Le Foll (2011). "Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how?" *Endocrinology* 152: 2552-2557.

Li, J., H. Y. Shuai, E. Gylfe and A. Tengholm (2013). "Oscillations of sub-membrane ATP in glucose-stimulated beta cells depend on negative feedback from Ca²⁺." *Diabetologia* 56: 1577-1586.

Liu, Y. J., A. Tengholm, E. Grapengiesser, B. Hellman and E. Gylfe (1998). "Origin of slow and fast oscillations of Ca²⁺ in mouse pancreatic islets." *J Physiol* 508 (Pt 2): 471-481.

Liu, Y. J., E. Vieira and E. Gylfe (2004). "A store-operated mechanism determines the activity of the electrically excitable glucagon-secreting pancreatic alpha-cell." *Cell Calcium* 35: 357-365.

Longo, E. A., K. Tornheim, J. T. Deeney, B. A. Varnum, D. Tillotson, M. Prentki and B. E. Corkey (1991). "Oscillations in cytosolic free Ca²⁺, oxygen consumption, and insulin secretion in glucose-stimulated rat pancreatic islets." *J Biol Chem* 266: 9314-9319.

Lu, D., H. Mulder, P. Zhao, S. C. Burgess, M. V. Jensen, S. Kamzolova, C. B. Newgard and A. D. Sherry (2002). "13C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2708-2713.

Luciani, D. S., S. Misler and K. S. Polonsky (2006). "Ca²⁺ controls slow NAD(P)H oscillations in glucose-stimulated mouse pancreatic islets." *J Physiol* 572: 379-392.

Lyssenko, V., P. Almgren, D. Anevski, R. Perfekt, K. Lahti, M. Nissen, B. Isomaa, B. Forsen, N. Homstrom, C. Saloranta, M. R. Taskinen, L. Groop, T. Tuomi and g. Botnia study (2005). "Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes." *Diabetes* 54: 166-174.

M

Ma, X., Y. Zhang, J. Gromada, S. Sewing, P. O. Berggren, K. Buschard, A. Salehi, J. Vikman, P. Rorsman and L. Eliasson (2005). "Glucagon stimulates exocytosis

in mouse and rat pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors." *Mol Endocrinol* 19: 198-212.

MacDonald, M. J. (1993). "Estimates of glycolysis, pyruvate (de)carboxylation, pentose phosphate pathway, and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets." *Arch Biochem Biophys* 305: 205-214.

MacDonald, M. J., L. A. Fahien, L. J. Brown, N. M. Hasan, J. D. Buss and M. A. Kendrick (2005a). "Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1-15.

MacDonald, M. J., L. A. Fahien, J. D. Buss, N. M. Hasan, M. J. Fallon and M. A. Kendrick (2003). "Citrate oscillates in liver and pancreatic beta cell mitochondria and in INS-1 insulinoma cells." *J Biol Chem* 278: 51894-51900.

MacDonald, P. E., J. W. Joseph and P. Rorsman (2005b). "Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 2211-2225.

MacDonald, P. E., S. Sewing, J. Wang, J. W. Joseph, S. R. Smukler, G. Sakellariopoulos, J. Wang, M. C. Saleh, C. B. Chan, R. G. Tsushima, A. M. Salapatek and M. B. Wheeler (2002). "Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K⁺ channels in pancreatic beta-cells enhances glucose-dependent insulin secretion." *J Biol Chem* 277: 44938-44945.

Madsen, O. D. (2007). "Pancreas phylogeny and ontogeny in relation to a 'pancreatic stem cell'." *C R Biol* 330: 534-537.

Magnan, C. and A. Ktorza (2005). "Production et sécrétion de l'insuline par la cellule B pancréatique." *EMC-Endocrinologie* 2: 241-264.

Malaisse, W. J. and F. Malaisse-Lagae (1984). "The role of cyclic AMP in insulin release." *Experientia* 40: 1068-1074.

Marandiykina, A., N. Palacios-Prado, L. Rimkute, V. A. Skeberdis and F. F. Bukauskas (2013). "Regulation of connexin36 gap junction channels by n-alkanols and arachidonic acid." *J Physiol* 591: 2087-2101.

Marchetti, P., D. W. Scharp, M. McLearn, R. Gingerich, E. Finke, B. Olack, C. Swanson, R. Giannarelli, R. Navalesi and P. E. Lacy (1994). "Pulsatile insulin secretion from isolated human pancreatic islets." *Diabetes* 43: 827-830.

Marks, V., L. Morgan, J. Oben and R. Elliott (1991). "Gut hormones in glucose homeostasis." *Proc Nutr Soc* 50: 545-552.

Marsault, R., M. Murgia, T. Pozzan and R. Rizzuto (1997). "Domains of high Ca²⁺ beneath the plasma membrane of living A7r5 cells." *EMBO J* 16: 1575-1581.

Matschinsky, F. M., B. Glaser and M. A. Magnuson (1998). "Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities." *Diabetes* 47: 307-315.

Matthews, D. R., K. Hermansen, A. A. Connolly, D. Gray, O. Schmitz, A. Clark, H. Orskov and R. C. Turner

(1987). "Greater in vivo than in vitro pulsatility of insulin secretion with synchronized insulin and somatostatin secretory pulses." *Endocrinology* 120: 2272-2278.

Matveyenko, A. V., D. Liuwantara, T. Gurlo, D. Kirakossian, C. Dalla Man, C. Cobelli, M. F. White, K. D. Copps, E. Volpi, S. Fujita and P. C. Butler (2012). "Pulsatile portal vein insulin delivery enhances hepatic insulin action and signaling." *Diabetes* 61: 2269-2279.

Matveyenko, A. V., J. D. Veldhuis and P. C. Butler (2008). "Measurement of pulsatile insulin secretion in the rat: direct sampling from the hepatic portal vein." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E569-574.

McCall, M. and A. M. Shapiro (2012). "Update on islet transplantation." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007823.

McCulloch, L. J., M. van de Bunt, M. Braun, K. N. Frayn, A. Clark and A. L. Gloyn (2011). "GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus." *Mol Genet Metab* 104: 648-653.

Meda, P., D. Bosco, M. Chanson, E. Giordano, L. Vallar, C. Wollheim and L. Orci (1990). "Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells." *J Clin Invest* 86: 759-768.

Meissner, H. P. and H. Schmelz (1974). "Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets." *Pflugers Arch* 351: 195-206.

Merrins, M. J., B. Fendler, M. Zhang, A. Sherman, R. Bertram and L. S. Satin (2010). "Metabolic oscillations in pancreatic islets depend on the intracellular Ca²⁺ level but not Ca²⁺ oscillations." *Biophys J* 99: 76-84.

Merrins, M. J., A. R. Van Dyke, A. K. Mapp, M. A. Rizzo and L. S. Satin (2013). "Direct measurements of oscillatory glycolysis in pancreatic islet beta-cells using novel fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensors for pyruvate kinase M2 activity." *J Biol Chem* 288: 33312-33322.

Mertz, R. J., J. F. Worley, B. Spencer, J. H. Johnson and I. D. Dukes (1996). "Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells by specific products of glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis." *J Biol Chem* 271: 4838-4845.

Mese, G., G. Richard and T. W. White (2007). "Gap junctions: basic structure and function." *J Invest Dermatol* 127: 2516-2524.

Michael, D. J., W. Xiong, X. Geng, P. Drain and R. H. Chow (2007). "Human insulin vesicle dynamics during pulsatile secretion." *Diabetes* 56: 1277-1288.

Miki, T., B. Liss, K. Minami, T. Shiuchi, A. Saraya, Y. Kashima, M. Horiuchi, F. Ashcroft, Y. Minokoshi, J. Roeper and S. Seino (2001). "ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis." *Nat Neurosci* 4: 507-512.

Minami, K. and S. Seino (2013). "Current status of regeneration of pancreatic beta-cells." *J Diabetes Investig* 4: 131-141.

Mithieux, G. (2014a). "Crosstalk between gastrointestinal neurons and the brain in the control of food intake." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28: 739-744.

Mithieux, G. (2014b). "Metabolic effects of portal vein sensing." *Diabetes Obes Metab* 16 Suppl 1: 56-60.

Mithieux, G. and A. Gautier-Stein (2014). "Intestinal glucose metabolism revisited." *Diabetes Res Clin Pract* 105: 295-301.

Miura, R. M. and M. Pernarowski (1995). "Correlations of rates of insulin release from islets and plateau fractions for beta-cells." *Bull Math Biol* 57: 229-246.

Moghissi, E. and A. B. King (2014). "Individualizing Insulin Therapy in the Management of Type 2 Diabetes." *Am J Med* 127: S3-S10.

Moreno, A. P., V. M. Berthoud, G. Perez-Palacios and E. M. Perez-Armendariz (2005). "Biophysical evidence that connexin-36 forms functional gap junction channels between pancreatic mouse beta-cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E948-956.

Moreno, A. P. and A. F. Lau (2007). "Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation." *Prog Biophys Mol Biol* 94: 107-119.

Moriyama, Y. and M. Hayashi (2003). "Glutamate-mediated signaling in the islets of Langerhans: a thread entangled." *Trends Pharmacol Sci* 24: 511-517.

Morton, G. J., T. H. Meek and M. W. Schwartz (2014). "Neurobiology of food intake in health and disease." *Nat Rev Neurosci* 15: 367-378.

Mosedale, M., S. Egodage, R. C. Calma, N. W. Chi and S. D. Chessler (2012). "Neurexin-1 α contributes to insulin-containing secretory granule docking." *J Biol Chem* 287: 6350-6361.

Moulle, V. S., A. Picard, C. Le Foll, B. E. Levin and C. Magnan (2014). "Lipid sensing in the brain and regulation of energy balance." *Diabetes Metab* 40: 29-33.

Mourad, N. I., M. Nenquin and J. C. Henquin (2010). "Metabolic amplifying pathway increases both phases of insulin secretion independently of beta-cell actin microfilaments." *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C389-398.

Mulder, H., D. Lu, J. t. Finley, J. An, J. Cohen, P. A. Antinozzi, J. D. McGarry and C. B. Newgard (2001). "Overexpression of a modified human malonyl-CoA decarboxylase blocks the glucose-induced increase in malonyl-CoA level but has no impact on insulin secretion in INS-1-derived (832/13) beta-cells." *J Biol Chem* 276: 6479-6484.

Mulle, C., A. Sailer, I. Perez-Otano, H. Dickinson-Anson, P. E. Castillo, I. Bureau, C. Maron, F. H. Gage, J. R. Mann, B. Bettler and S. F. Heinemann (1998). "Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-

induced seizures in GluR6-deficient mice." *Nature* 392: 601-605.

Münzberg, H. and C. D. Morrison (2014). "Structure, production and signaling of leptin." *Metabolism*.

N

Nadkarni, P., O. G. Chepurny and G. G. Holz (2014). "Regulation of glucose homeostasis by GLP-1." *Prog Mol Biol Transl Sci* 121: 23-65.

Nam, Y. and B. C. Wheeler (2011). "In vitro microelectrode array technology and neural recordings." *Crit Rev Biomed Eng* 39: 45-61.

Negre-Salvayre, A., R. Salvayre, N. Auge, R. Pamplona and M. Portero-Otin (2009). "Hyperglycemia and glycation in diabetic complications." *Antioxid Redox Signal* 11: 3071-3109.

Nett, P. C., H. W. Sollinger and T. Alam (2003). "Hepatic insulin gene therapy in insulin-dependent diabetes mellitus." *Am J Transplant* 3: 1197-1203.

Netter, F. H. (2014). *Abdomen. Atlas of Human Anatomy*

Saunders: 242-328.

Newgard, C. B. and J. D. McGarry (1995). "Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction." *Annu Rev Biochem* 64: 689-719.

Nguyen, Q. V., A. Caro, M. Raoux, A. Quotb, J. B. Floderer, Y. Bornat, S. Renaud and J. Lang (2013). "A novel bioelectronic glucose sensor to process distinct electrical activities of pancreatic beta-cells." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2013: 172-175.

Nilsson, T., V. Schultz, P. O. Berggren, B. E. Corkey and K. Tornheim (1996). "Temporal patterns of changes in ATP/ADP ratio, glucose 6-phosphate and cytoplasmic free Ca²⁺ in glucose-stimulated pancreatic beta-cells." *Biochem J* 314 (Pt 1): 91-94.

Nolan, C. J., M. S. Madiraju, V. Delghingaro-Augusto, M. L. Peyot and M. Prentki (2006). "Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion." *Diabetes* 55 Suppl 2: S16-23.

Nunemaker, C. S. and L. S. Satin (2004). "Comparison of metabolic oscillations from mouse pancreatic beta cells and islets." *Endocrine* 25: 61-67.

Nunemaker, C. S., M. Zhang, D. H. Wasserman, O. P. McGuinness, A. C. Powers, R. Bertram, A. Sherman and L. S. Satin (2005). "Individual mice can be distinguished by the period of their islet calcium oscillations: is there an intrinsic islet period that is imprinted in vivo?" *Diabetes* 54: 3517-3522.

O

Obici, S. and P. J. Martins (2010). The role of brain in glucose homeostasis. *Principles of Diabetes Mellitus*. L. Poretzky, Springer: 89-104.

Olofsson, C. S., S. O. Gopel, S. Barg, J. Galvanovskis, X. Ma, A. Salehi, P. Rorsman and L. Eliasson (2002). "Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells." *Pflugers Arch* 444: 43-51.

Oomura, Y., T. Nakamura, M. Sugimori and Y. Yamada (1975). "Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons." *Physiol Behav* 14: 483-486.

Orci, L., M. Ravazzola, M. J. Storch, R. G. Anderson, J. D. Vassalli and A. Perrelet (1987). "Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles." *Cell* 49: 865-868.

Orci, L. and R. H. Unger (1975). "Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells." *Lancet* 2: 1243-1244.

Orlando, G., P. Gianello, M. Salvatori, R. J. Stratta, S. Soker, C. Ricordi and J. Dominguez-Bendala (2014). "Cell replacement strategies aimed at reconstitution of the beta-cell compartment in type 1 diabetes." *Diabetes* 63: 1433-1444.

Ortsater, H., P. Liss, P. E. Lund, K. E. Akerman and P. Bergsten (2000). "Oscillations in oxygen tension and insulin release of individual pancreatic ob/ob mouse islets." *Diabetologia* 43: 1313-1318.

Oshima, A. (2014). "Structure and closure of connexin gap junction channels." *FEBS Lett* 588: 1230-1237.

Ostenson, C. G. (1979). "Regulation of glucagon release: effects of insulin on the pancreatic A2-cell of the guinea pig." *Diabetologia* 17: 325-330.

Ozawa, S. and O. Sand (1986). "Electrophysiology of excitable endocrine cells." *Physiol Rev* 66: 887-952.

P

Palti, Y., G. B. David, E. Lachov, Y. H. Mida and R. Schatzberger (1996). "Islets of Langerhans generate wavelike electric activity modulated by glucose concentration." *Diabetes* 45: 595-601.

Pandol, S. J. (2011). Introduction. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease*. D. N. Granger and J. P. Granger, Morgan & Claypool Life Sciences.

Parker, H. E., F. M. Gribble and F. Reimann (2014). "The role of gut endocrine cells in control of metabolism and appetite." *Exp Physiol* 99: 1116-1120.

Peracchia, C., G. Bernardini and L. L. Peracchia (1983). "Is calmodulin involved in the regulation of gap junction permeability?" *Pflugers Arch* 399: 152-154.

Perez-Armendariz, E. M. (2013). "Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function." *Neuropharmacology* 75: 557-566.

Perez-Armendariz, M., C. Roy, D. C. Spray and M. V. Bennett (1991). "Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells." *Biophys J* 59: 76-92.

Pettersen, K. H., H. Linden, A. M. Dale and E. G.T. (2012). Extracellular spikes and current-source density. *Handbook of Neural Activity Measurement*. R. Brette and A. Destexhe, Cambridge University Press: 92-135.

Pfanner, N., B. S. Glick, S. R. Arden and J. E. Rothman (1990). "Fatty acylation promotes fusion of transport vesicles with Golgi cisternae." *J Cell Biol* 110: 955-961.

Pfanner, N., L. Orci, B. S. Glick, M. Amherdt, S. R. Arden, V. Malhotra and J. E. Rothman (1989). "Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae." *Cell* 59: 95-102.

Pfeiffer, T., U. Kraushaar, M. Dufer, S. Schonecker, D. Haspel, E. Gunther, G. Drews and P. Krippeit-Drews (2011). "Rapid functional evaluation of beta-cells by extracellular recording of membrane potential oscillations with microelectrode arrays." *Pflugers Arch* 462: 835-840.

Pipeleers, D., R. Kiekens, Z. Ling, A. Wilikens and F. Schuit (1994). "Physiologic relevance of heterogeneity in the pancreatic beta-cell population." *Diabetologia* 37 Suppl 2: S57-64.

Pipeleers, D. G. (1992). "Heterogeneity in pancreatic beta-cell population." *Diabetes* 41: 777-781.

Polakof, S., T. P. Mommsen and J. L. Soengas (2011). "Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 160: 123-149.

Porksen, N., S. Munn, J. Steers, J. D. Veldhuis and P. C. Butler (1995). "Impact of sampling technique on appraisal of pulsatile insulin secretion by deconvolution and cluster analysis." *Am J Physiol* 269: E1106-1114.

Porksen, N., B. Nyholm, J. D. Veldhuis, P. C. Butler and O. Schmitz (1997). "In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts." *Am J Physiol* 273: E908-914.

Porte, D., Jr. (1991). "Banting lecture 1990. Beta-cells in type II diabetes mellitus." *Diabetes* 40: 166-180.

Porter, J. R. and T. G. Barrett (2005). "Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and beta cell failure." *J Med Genet* 42: 893-902.

Potolicchio, I., V. Cigliola, S. Velazquez-Garcia, P. Klee, A. Valjevac, D. Kapic, E. Cosovic, O. Lepara, A. Hadzovic-Dzuvo, Z. Mornjacovic and P. Meda (2012).

"Connexin-dependent signaling in neuro-hormonal systems." *Biochim Biophys Acta* 1818: 1919-1936.

Pralong, W. F., A. Spat and C. B. Wollheim (1994). "Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular Ca^{2+} transients." *J Biol Chem* 269: 27310-27314.

Prentki, M. and B. E. Corkey (1996). "Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?" *Diabetes* 45: 273-283.

Prentki, M. and F. M. Matschinsky (1987). " Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion." *Physiol Rev* 67: 1185-1248.

Proks, P. and F. M. Ashcroft (2008). ATP-sensitive Potassium Channels in Health and Disease. Pancreatic Beta Cell in Health and Disease. S. Seino and G. I. Bell, Springer: 431-450.

Q

Quesada, I., E. Tuduri, C. Ripoll and A. Nadal (2008). "Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes." *J Endocrinol* 199: 5-19.

Quoth, A., Y. Bornat, M. Raoux, J. Lang and S. Renaud (2012). NeuroBetaMed: A re-configurable wavelet-based event detection circuit for in vitro biological signals. Circuits and Systems (ISCAS), 2012 IEEE International Symposium on.

R

Rahier, J., Y. Guiot, R. M. Goebbels, C. Sempoux and J. C. Henquin (2008). "Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4: 32-42.

Randle, P. J. (1964). "The Interrelationships of Hormones, Fatty Acid and Glucose in the Provision of Energy." *Postgrad Med J* 40: 457-463.

Raoux, M., G. Bontorin, Y. Bornat, J. Lang and S. Renaud (2011). Bioelectronic Sensing of Insulin Demand. Biohybrid Systems, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 191-202.

Raoux, M., Y. Bornat, A. Quoth, B. Catargi, S. Renaud and J. Lang (2012). "Non-invasive long-term and real-time analysis of endocrine cells on micro-electrode arrays." *J Physiol* 590: 1085-1091.

Raoux, M., P. Vacher, J. Papin, A. Picard, E. Kostrzewa, A. Devin, J. Gaitan, I. Limon, M. J. Kas, C. Magnan and J. Lang (2014). "Multilevel control of glucose homeostasis by adenylyl cyclase 8." *Diabetologia*.

Ravier, M. A., M. Guldenagel, A. Charollais, A. Gjinovci, D. Caille, G. Sohl, C. B. Wollheim, K. Willecke, J. C. Henquin and P. Meda (2005). "Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca^{2+} and insulin oscillations, and basal insulin release." *Diabetes* 54: 1798-1807.

Ravier, M. A. and G. A. Rutter (2005). "Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells." *Diabetes* 54: 1789-1797.

Ray, S. (2014). "Challenges in the quantification and interpretation of spike-LFP relationships." *Curr Opin Neurobiol* 31C: 111-118.

Regazzi, R., C. B. Wollheim, J. Lang, J. M. Theler, O. Rossetto, C. Montecucco, K. Sadoul, U. Weller, M. Palmer and B. Thorens (1995). "VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca^{2+} -but not for GTP gamma S-induced insulin secretion." *EMBO J* 14: 2723-2730.

Ren, J., A. Sherman, R. Bertram, P. B. Goforth, C. S. Nunemaker, C. D. Waters and L. S. Satin (2013). "Slow oscillations of KATP conductance in mouse pancreatic islets provide support for electrical bursting driven by metabolic oscillations." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E805-817.

Renaud, S., B. Catargi and J. Lang (2014). "Biosensors in Diabetes : How to get the most out of evolution and transpose it into a signal." *IEEE Pulse* 5: 30-34.

Renstrom, E., W. G. Ding, K. Bokvist and P. Rorsman (1996). "Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin." *Neuron* 17: 513-522.

Renstrom, E. and P. Rorsman (2008). Regulation of Insulin Granule Exocytosis. Pancreatic Beta Cell in Health and Disease. S. Seino and G. I. Bell, Springer: 431-450.

Rindi, G., L. Licini, V. Necchi, L. Bottarelli, N. Campanini, C. Azzoni, M. Favret, G. Giordano, F. D'Amato, C. Brancia, E. Solcia and G. L. Ferri (2007). "Peptide products of the neurotrophin-inducible gene *vgf* are produced in human neuroendocrine cells from early development and increase in hyperplasia and neoplasia." *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2811-2815.

Ritzel, R. A., J. D. Veldhuis and P. C. Butler (2006). "The mass, but not the frequency, of insulin secretory bursts in isolated human islets is entrained by oscillatory glucose exposure." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E750-756.

Rizzuto, R. and T. Pozzan (2006). "Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences." *Physiol Rev* 86: 369-408.

Rodriguez-Diaz, R., M. H. Abdulreda, A. L. Formoso, I. Gans, C. Ricordi, P. O. Berggren and A. Caicedo (2011a). "Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas." *Cell Metab* 14: 45-54.

Rodriguez-Diaz, R. and A. Caicedo (2014). "Neural control of the endocrine pancreas." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28: 745-756.

Rodriguez-Diaz, R., R. Dando, M. C. Jacques-Silva, A. Fachado, J. Molina, M. H. Abdulreda, C. Ricordi, S. D. Roper, P. O. Berggren and A. Caicedo (2011b). "Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans." *Nat Med* 17: 888-892.

Rodriguez-Diaz, R., D. Menegaz and A. Caicedo (2014). "Neurotransmitters act as paracrine signals to regulate insulin secretion from the human pancreatic islet." *J Physiol* 592: 3413-3417.

Roger, B., J. Papin, P. Vacher, M. Raoux, A. Mulot, M. Dubois, J. Kerr-Conte, B. H. Voy, F. Pattou, G. Charpentier, J. C. Jonas, N. Moustaid-Moussa and J. Lang (2011). "Adenylyl cyclase 8 is central to glucagon-like peptide 1 signalling and effects of chronically elevated glucose in rat and human pancreatic beta cells." *Diabetologia* 54: 390-402.

Rorsman, P. (1997). "The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint." *Diabetologia* 40: 487-495.

Rorsman, P., P. O. Berggren, K. Bokvist, H. Ericson, H. Mohler, C. G. Ostenson and P. A. Smith (1989). "Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels." *Nature* 341: 233-236.

Rorsman, P. and M. Braun (2013). "Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets." *Annu Rev Physiol* 75: 155-179.

Rorsman, P., M. Braun and Q. Zhang (2012). "Regulation of calcium in pancreatic alpha- and beta-cells in health and disease." *Cell Calcium* 51: 300-308.

Rorsman, P., L. Eliasson, T. Kanno, Q. Zhang and S. Gopel (2011). "Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of Langerhans." *Prog Biophys Mol Biol* 107: 224-235.

Rorsman, P., L. Eliasson, E. Renstrom, J. Gromada, S. Barg and S. Gopel (2000). "The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion." *News Physiol Sci* 15: 72-77.

Rorsman, P. and E. Renstrom (2003). "Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells." *Diabetologia* 46: 1029-1045.

Rorsman, P., S. A. Salehi, F. Abdulkader, M. Braun and P. E. MacDonald (2008). "K(ATP)-channels and glucose-regulated glucagon secretion." *Trends Endocrinol Metab* 19: 277-284.

Rosario, L. M., R. M. Barbosa, C. M. Antunes, A. M. Silva, A. J. Abrunhosa and R. M. Santos (1993). "Bursting electrical activity in pancreatic beta-cells: evidence that the channel underlying the burst is sensitive to Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels." *Pflügers Arch* 424: 439-447.

Rosati, B., P. Marchetti, O. Crociani, M. Lecchi, R. Lupi, A. Arcangeli, M. Olivotto and E. Wanke (2000).

"Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K(+) channels in firing and release." *FASEB J* 14: 2601-2610.

Rutter, G. A., T. Tsuboi and M. A. Ravier (2006). "Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion." *Cell Calcium* 40: 539-551.

Ryan, E. A., J. R. Lakey, R. V. Rajotte, G. S. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J. F. Elliott, D. Bigam, N. M. Kneteman, G. L. Warnock, I. Larsen and A. M. Shapiro (2001). "Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol." *Diabetes* 50: 710-719.

S

Sadoul, K., J. Lang, C. Montecucco, U. Weller, R. Regazzi, S. Catsicas, C. B. Wollheim and P. A. Halban (1995). "SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release." *J Cell Biol* 128: 1019-1028.

Sanger, F. (1959). "Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes." *Science* 129: 1340-1344.

Satin, L. S. and T. A. Kinard (1998). "Neurotransmitters and their receptors in the islets of Langerhans of the pancreas: what messages do acetylcholine, glutamate, and GABA transmit?" *Endocrine* 8: 213-223.

Scemes, E., D. C. Spray and P. Meda (2009). "Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels"." *Pflügers Arch* 457: 1207-1226.

Schonecker, S., U. Kraushaar, M. Dufer, A. Sahr, C. Hardtner, E. Guenther, R. Walther, U. Lendeckel, W. Barthlen, P. Krippeit-Drews and G. Drews (2014). "Long-term culture and functionality of pancreatic islets monitored using microelectrode arrays." *Integr Biol (Camb)* 6: 540-544.

Schönecker, S., U. Kraushaar, M. Dufer, A. Sahr, C. Hardtner, E. Guenther, R. Walther, U. Lendeckel, W. Barthlen, P. Krippeit-Drews and G. Drews (2014). "Long-term culture and functionality of pancreatic islets monitored using microelectrode arrays." *Integr Biol (Camb)* 6: 540-544.

Schuit, F., A. De Vos, S. Farfari, K. Moens, D. Pipeleers, T. Brun and M. Prentki (1997). "Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells." *J Biol Chem* 272: 18572-18579.

Schuit, F. C., P. Huypens, H. Heimberg and D. G. Pipeleers (2001). "Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus." *Diabetes* 50: 1-11.

Schulla, V., E. Renstrom, R. Feil, S. Feil, I. Franklin, A. Gjinovci, X. J. Jing, D. Laux, I. Lundquist, M. A.

- Magnuson, S. Obermuller, C. S. Olofsson, A. Salehi, A. Wendt, N. Klugbauer, C. B. Wollheim, P. Rorsman and F. Hofmann (2003). "Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺-channel null mice." *EMBO J* 22: 3844-3854.
- Schwartz, M. W., D. P. Figlewicz, D. G. Baskin, S. C. Woods and D. Porte, Jr. (1992). "Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance." *Endocr Rev* 13: 387-414.
- Scrocchi, L. A., T. J. Brown, N. McClusky, P. L. Brubaker, A. B. Auerbach, A. L. Joyner and D. J. Drucker (1996). "Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene." *Nat Med* 2: 1254-1258.
- Seino, S. (2012). "Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea." *Diabetologia* 55: 2096-2108.
- Seino, S. and T. Shibasaki (2005). "PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis." *Physiol Rev* 85: 1303-1342.
- Seino, S., T. Shibasaki and K. Minami (2010). "Pancreatic beta-cell signaling: toward better understanding of diabetes and its treatment." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86: 563-577.
- Seino, S., T. Shibasaki and K. Minami (2011). "Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes." *J Clin Invest* 121: 2118-2125.
- Seng, G., P. Gross, J. Louis, C. Couet and P. Drouin (1985). "[Mechanisms and consequences of hypoglycemia]." *Rev Prat* 35: 1859-1866.
- Serre-Beinier, V., D. Bosco, L. Zulianello, A. Charollais, D. Caille, E. Charpentier, B. R. Gauthier, G. R. Diaferia, B. N. Giepmans, R. Lupi, P. Marchetti, S. Deng, L. Buhler, T. Berney, V. Cirulli and P. Meda (2009). "Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression." *Hum Mol Genet* 18: 428-439.
- Serre-Beinier, V., S. Le Gurun, N. Belluardo, A. Trovato-Salinaro, A. Charollais, J. A. Haeffliger, D. F. Condorelli and P. Meda (2000). "Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets." *Diabetes* 49: 727-734.
- Seufert, J. (2004). "Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function." *Diabetes* 53 Suppl 1: S152-158.
- Shibasaki, T., H. Takahashi, T. Miki, Y. Sunaga, K. Matsumura, M. Yamanaka, C. Zhang, A. Tamamoto, T. Satoh, J. Miyazaki and S. Seino (2007). "Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19333-19338.
- Shrayyef, M. Z. and J. Gerich (2010). *Normal Glucose Homeostasis. Principles of Diabetes Mellitus*. L. Poretsky, Springer: 19-35.
- Sinclair, E. M. and D. J. Drucker (2005). "Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential." *Physiology (Bethesda)* 20: 357-365.
- Smilek, D. E., M. R. Ehlers and G. T. Nepom (2014). "Restoring the balance: immunotherapeutic combinations for autoimmune disease." *Dis Model Mech* 7: 503-513.
- Smith, P. A., F. M. Ashcroft and P. Rorsman (1990). "Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated K(+) currents in isolated mouse pancreatic beta-cells." *FEBS Lett* 261: 187-190.
- Smith, P. A., M. R. Duchon and F. M. Ashcroft (1995). "A fluorimetric and amperometric study of calcium and secretion in isolated mouse pancreatic beta-cells." *Pflugers Arch* 430: 808-818.
- Sobrinho Crespo, C., A. Perianes Cachero, L. Puebla Jimenez, V. Barrios and E. Arilla Ferreiro (2014). "Peptides and food intake." *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 58.
- Sohl, G., S. Maxeiner and K. Willecke (2005). "Expression and functions of neuronal gap junctions." *Nat Rev Neurosci* 6: 191-200.
- Sohl, G. and K. Willecke (2003). "An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man." *Cell Commun Adhes* 10: 173-180.
- Soltani, N., H. Qiu, M. Aleksic, Y. Glinka, F. Zhao, R. Liu, Y. Li, N. Zhang, R. Chakrabarti, T. Ng, T. Jin, H. Zhang, W. Y. Lu, Z. P. Feng, G. J. Prud'homme and Q. Wang (2011). "GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11692-11697.
- Song, S. H., S. S. McIntyre, H. Shah, J. D. Veldhuis, P. C. Hayes and P. C. Butler (2000). "Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4491-4499.
- Sosinsky, G. E. and B. J. Nicholson (2005). "Structural organization of gap junction channels." *Biochim Biophys Acta* 1711: 99-125.
- Spargo, E., O. E. Pratt and P. M. Daniel (1979). "Metabolic functions of skeletal muscles of man, mammals, birds and fishes: a review." *J R Soc Med* 72: 921-925.
- Speier, S., A. Gjinovci, A. Charollais, P. Meda and M. Rupnik (2007). "Cx36-mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics." *Diabetes* 56: 1078-1086.
- Spijker, H. S., R. B. Ravelli, A. M. Mommaas-Kienhuis, A. A. van Apeldoorn, M. A. Engelse, A. Zaldumbide, S. Bonner-Weir, T. J. Rabelink, R. C. Hoeben, H. Clevers, C. L. Mummery, F. Carlotti and E. J. de Koning (2013). "Conversion of mature human beta-cells into glucagon-producing alpha-cells." *Diabetes* 62: 2471-2480.
- Spira, M. E. and A. Hai (2013). "Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology." *Nat Nanotechnol* 8: 83-94.

Stagner, J. I. and E. Samols (1992). "The vascular order of islet cellular perfusion in the human pancreas." *Diabetes* 41: 93-97.

Stagner, J. I., E. Samols and V. Marks (1989). "The anterograde and retrograde infusion of glucagon antibodies suggests that A cells are vascularly perfused before D cells within the rat islet." *Diabetologia* 32: 203-206.

Stagner, J. I., E. Samols and G. C. Weir (1980). "Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration." *J Clin Invest* 65: 939-942.

Starke, A., T. Imamura and R. H. Unger (1987). "Relationship of glucagon suppression by insulin and somatostatin to the ambient glucose concentration." *J Clin Invest* 79: 20-24.

Stein, D. T., B. E. Stevenson, M. W. Chester, M. Basit, M. B. Daniels, S. D. Turley and J. D. McGarry (1997). "The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation." *J Clin Invest* 100: 398-403.

Steiner, D. F. (2008). *The Biosynthesis of Insulin. Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. S. Seino and G. I. Bell, Springer: 31-49.

Stett, A., U. Egert, E. Guenther, F. Hofmann, T. Meyer, W. Nisch and H. Haemmerle (2003). "Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research." *Anal Bioanal Chem* 377: 486-495.

Stumvoll, M., C. Meyer, M. Kreider, G. Perriello and J. Gerich (1998). "Effects of glucagon on renal and hepatic glutamine gluconeogenesis in normal postabsorptive humans." *Metabolism* 47: 1227-1232.

Suckow, A. T., D. Comoletti, M. A. Waldrop, M. Mosedale, S. Egodage, P. Taylor and S. D. Chessler (2008). "Expression of neurexin, neuroligin, and their cytoplasmic binding partners in the pancreatic beta-cells and the involvement of neuroligin in insulin secretion." *Endocrinology* 149: 6006-6017.

Sudhof, T. C. (2001). "alpha-Latrotoxin and its receptors: neurexins and CIRL/latrophilins." *Annu Rev Neurosci* 24: 933-962.

Sudhof, T. C. (2013). "Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle." *Neuron* 80: 675-690.

Sudhof, T. C. and J. E. Rothman (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins." *Science* 323: 474-477.

T

Teff, K. L. (2011). "How neural mediation of anticipatory and compensatory insulin release helps us tolerate food." *Physiol Behav* 103: 44-50.

Tengholm, A. and E. Gylfe (2009). "Oscillatory control of insulin secretion." *Mol Cell Endocrinol* 297: 58-72.

Thorens, B. (2001). "GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review)." *Mol Membr Biol* 18: 265-273.

Thorens, B. (2008). "Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes." *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 6: S62-71.

Thorens, B. (2011). "Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion." *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1: 82-88.

Thorens, B. (2014). "Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function." *Diabetes Obes Metab* 16 Suppl 1: 87-95.

Thorens, B., H. K. Sarkar, H. R. Kaback and H. F. Lodish (1988). "Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells." *Cell* 55: 281-290.

Tian, G., S. Sandler, E. Gylfe and A. Tengholm (2011). "Glucose- and hormone-induced cAMP oscillations in alpha- and beta-cells within intact pancreatic islets." *Diabetes* 60: 1535-1543.

Tomkin, G. H. (2014). "Treatment of type 2 diabetes, lifestyle, GLP1 agonists and DPP4 inhibitors." *World J Diabetes* 5: 636-650.

Tong, Q., R. Ouedraogo and A. L. Kirchgessner (2002). "Localization and function of group III metabotropic glutamate receptors in rat pancreatic islets." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1324-1333.

Tsien, R. Y. (2009). "Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture)." *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 5612-5626.

Tucker, S. J., F. M. Gribble, C. Zhao, S. Trapp and F. M. Ashcroft (1997). "Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor." *Nature* 387: 179-183.

Tuomi, T., N. Santoro, S. Caprio, M. Cai, J. Weng and L. Groop (2014). "The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity." *Lancet* 383: 1084-1094.

U

Ullrich, S. and C. B. Wollheim (1988). "GTP-dependent inhibition of insulin secretion by epinephrine in permeabilized RINm5F cells. Lack of correlation between insulin secretion and cyclic AMP levels." *J Biol Chem* 263: 8615-8620.

Unger, R. H. and A. D. Cherrington (2012). "Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover." *J Clin Invest* 122: 4-12.

Unger, R. H. and L. Orci (1975). "The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus." *Lancet* 1: 14-16.

V

Valdeolmillos, M., R. M. Santos, D. Contreras, B. Soria and L. M. Rosario (1989). "Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans." *FEBS Lett* 259: 19-23.

Vallar, L., T. J. Biden and C. B. Wollheim (1987). "Guanine nucleotides induce Ca^{2+} -independent insulin secretion from permeabilized RINm5F cells." *J Biol Chem* 262: 5049-5056.

Van Schravendijk, C. F., R. Kiekens and D. G. Pipeleers (1992). "Pancreatic beta cell heterogeneity in glucose-induced insulin secretion." *J Biol Chem* 267: 21344-21348.

Vasseur, M., A. Debuyser and M. Joffre (1987). "Sensitivity of pancreatic beta cell to calcium channel blockers. An electrophysiologic study of verapamil and nifedipine." *Fundam Clin Pharmacol* 1: 95-113.

Verberne, A. J., A. Sabetghadam and W. S. Korim (2014). "Neural pathways that control the glucose counterregulatory response." *Front Neurosci* 8: 38.

Vieira, E., A. Salehi and E. Gylfe (2007). "Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells." *Diabetologia* 50: 370-379.

W

Wang, Z. L., W. M. Bennet, R. M. Wang, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (1994). "Evidence of a paracrine role of neuropeptide-Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats." *Endocrinology* 135: 200-206.

Weaver, C. D., V. Gundersen and T. A. Verdoorn (1998). "A high affinity glutamate/aspartate transport system in pancreatic islets of Langerhans modulates glucose-stimulated insulin secretion." *J Biol Chem* 273: 1647-1653.

Weaver, C. D., T. L. Yao, A. C. Powers and T. A. Verdoorn (1996). "Differential expression of glutamate receptor subtypes in rat pancreatic islets." *J Biol Chem* 271: 12977-12984.

Wellershaus, K., J. Degen, J. Deuchars, M. Theis, A. Charollais, D. Caille, B. Gauthier, U. Janssen-Bienhold, S. Sonntag, P. Herrera, P. Meda and K. Willecke (2008). "A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells." *Exp Cell Res* 314: 997-1012.

Whalley, N. M., L. E. Pritchard, D. M. Smith and A. White (2011). "Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic alpha-cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on beta-cells?" *J Endocrinol* 211: 99-106.

Whim, M. D. (2011). "Pancreatic beta cells synthesize neuropeptide Y and can rapidly release peptide co-transmitters." *PLoS One* 6: e19478.

Wieczorek, G., A. Pospischil and E. Perentes (1998). "A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates)." *Exp Toxicol Pathol* 50: 151-172.

Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." *Diabetes Care* 27: 1047-1053.

Willecke, K., J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Guldenagel, U. Deutsch and G. Sohl (2002). "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome." *Biol Chem* 383: 725-737.

Wiser, O., M. Trus, A. Hernandez, E. Renstrom, S. Barg, P. Rorsman and D. Atlas (1999). "The voltage sensitive Lc-type Ca^{2+} channel is functionally coupled to the exocytotic machinery." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 248-253.

X

Xu, D., S. Prasad and S. D. Miller (2013). "Inducing immune tolerance: a focus on Type 1 diabetes mellitus." *Diabetes Manag (Lond)* 3: 415-426.

Xu, E., M. Kumar, Y. Zhang, W. Ju, T. Obata, N. Zhang, S. Liu, A. Wendt, S. Deng, Y. Ebina, M. B. Wheeler, M. Braun and Q. Wang (2006). "Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system." *Cell Metab* 3: 47-58.

Y

Yada, T., B. Damdindorj, R. S. Rita, T. Kurashina, A. Ando, M. Taguchi, M. Koizumi, H. Sone, M. Nakata, M. Kakei and K. Dezaki (2014). "Ghrelin signalling in beta-cells regulates insulin secretion and blood glucose." *Diabetes Obes Metab* 16 Suppl 1: 111-117.

Yang, J. (2014). "Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis." *Prog Mol Biol Transl Sci* 121: 133-163.

Yang, S. N. and P. O. Berggren (2006). "The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology." *Endocr Rev* 27: 621-676.

Yang, S. N., Y. Shi, G. Yang, Y. Li, J. Yu and P. O. Berggren (2014). "Ionic mechanisms in pancreatic beta cell signaling." *Cell Mol Life Sci* 71: 4149-4177.

Z

Zajac, J., A. Shrestha, P. Patel and L. Poretsky (2010). The main events in the history of Diabetes Mellitus. *Principles of Diabetes Mellitus*. L. Poretsky, Springer.

Zhang, C., A. T. Suckow and S. D. Chessler (2013). "Altered pancreatic islet function and morphology in mice lacking the Beta-cell surface protein neuroligin-2." *PLoS One* 8: e65711.

Zhao, C., M. C. Wilson, F. Schuit, A. P. Halestrap and G. A. Rutter (2001). "Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas." *Diabetes* 50: 361-366.

LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

Travaux de thèse:

Publication en cours de soumission :

- **Lebreton F**, Pirog A, Belouah I, Bosco D, Berney T, Meda P, Catargi B, Renaud S, Raoux R, Lang J: Slow potentials encode intercellular coupling and insulin demand in pancreatic beta-cells. (*Diabetologia*, *pending*).

Présentations orales

- **Lebreton F**, Raoux M, Bornat Y, Quotb A, Floderer JB, Gaitan J, Catargi B, Renaud S, Lang J : Diabchip : un nouveau capteur hybride de l'état physiologique des îlots de Langerhans et de la demande en insuline. Congrès annuel de la SFD 2014 à Paris, France. *Diabetes Metab* 40 :suppl1 page A12, 2014.
- **Lebreton F**, Pedraza E, Belouah I, Raoux M, Bornat Y, Catargi B, Kuhn A, Renaud S, Lang J : Isletchip for Pancreatic Endocrine Cells: From Bench to Bedside. 5th CNRS-GDR2904 "Multielectrode systems and Signal processing for Neuroscience" annual meeting in Gif-sur-Yvette, France, 2014.

Présentations par affiches

- **Lebreton F**, Caro A, Quotb A, Gaitan J, Laloum J, Bornat Y, Renaud S, Lang J, Raoux M : Multi-electrode arrays reveal glucose-dependent action potentials and slow waves that differ by their calcium sensitivity in mouse islet cells. 48th EASD Annual Meeting in Berlin, Germany, 2012. *Diabetes Metab* 55:[suppl1]s203-s204, 2012.
- **Lebreton F**, Caro A, Quotb A, Gaitan J, Laloum J, Bornat Y, Renaud S, Lang J, Raoux M : Multi-electrode arrays reveal glucose-dependent action potentials and slow waves that differ by their calcium sensitivity in mouse islet cells. EASD Islet Study Group Meeting in Rostock, Germany, 2012.
- Raoux M, Bornat Y, **Lebreton F**, Nguyen Q V, Caro A, Catargi B, Renaud S, Lang J : Multielectrode Array sensor technology in diabetology : glucose-dependent slow electrical waves in islets as a new biomarker for functional screening. 6th International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes, Paris, France, February 27–March 2, 2013. *Diabetes Technology & Therapeutics*. February 2013, 15(S1): A71-A72.
- **Lebreton F**, Caro A, Vinh Nguyen Q, Gaitan J, Catargi B, Bornat Y, Renaud S, Raoux M, Lang J : Deux types d'activités électriques dépendantes du glucose générées par les îlots de souris et identifiées par les multielectrodes arrays. Congrès annuel de la SFD 2013 à Montpellier, France. *Diabetes Metab* 39 :suppl1 page A24, 2013.
- Raoux M, **Lebreton F**, Bornat Y, Quotb A, Floderer J-B, Catargi B, Renaud S, Lang J : Diabchip, a Novel Method for Quality Control and Long-term Monitoring of Beta Cells and

Islets. 74th Annual Session, American Diabetes Society, San Francisco, June 13-17, 2014. Diabetes 63(S1) page A220.

- Pedraza P, Karajić A, **Lebreton F**, Raoux M, Gaitan J, Ravaine V, Kuhn A, Lang J : Un capteur hybride bioélectronique par enregistrement extracellulaire des cellules-beta: comment attirer les cellules sur les microélectrodes. Congrès annuel de la SFD 2014 à Paris, France. Diabetes Metab 40 :suppl1 page A28, 2014.
- **Lebreton F**, Raoux M, Bornat Y, Floderer JB, Bosco D, Gaitan J, Meda P, Berney T, Catargi B, Renaud S, Lang J : A cell-based hybrid biosensor for automatic real-time quality control of islets and sensing of insulin demand. 50th EASD Annual Meeting in Vienna, Austria, 2014. Diabetologia 57:[suppl1]s407-s408, 2014.
- Pedraza E, Karajić A, **Lebreton F**, Raoux M, Gaitan J, Ravaine V, Kuhn A, Lang J : Hurdles in bioelectronics sensors: how to guide cells toward electrodes? 50th EASD Annual Meeting in Vienna, Austria, 2014. Diabetologia 57:[suppl1]s408, 2014.
- Raoux M, Pedraza E, **Lebreton F**, Bornat Y, Floderer J-B, Catargi B, Renaud S, Lang J : Diabetachip: organ-on-chip for a novel cell-based biosensor in pretransplantation quality control and in treatment of type 1 diabetes. EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, Oahu, December 8-12, 2014.

Travaux antérieurs

Publications parues

- Pietropaolo S, Delage P, **Lebreton F**, Crusio WE, Cho YH: Early development of social deficits in APP and APP-PS1 mice. Neurobiol Aging 33:1002 e1017-1027, 2011.
- Pignatelli M, **Lebreton F**, Cho YH, Leinekugel X: "Ectopic" theta oscillations and interictal activity during slow-wave state in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. Neurobiol Dis 48:409-417, 2012.

Publication en révision :

- **Lebreton F**, Cayzac S, Pietropaolo S, Jeantet Y, Cho YH: Sleep physiology alterations precede plethoric phenotypic changes in R6/1 Huntington's disease mice (PlosOne).